

## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

## NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents  
United States Patent and Trademark  
Office  
Box PCT  
Washington, D.C.20231  
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

|   |   |
|---|---|
| Date of mailing (day/month/year)<br>04 April 2000 (04.04.00)            |   |
| International application No.<br>PCT/JP99/04249                         | Applicant's or agent's file reference<br>S-13-PCT           |
| International filing date (day/month/year)<br>04 August 1999 (04.08.99) | Priority date (day/month/year)<br>05 August 1998 (05.08.98) |
| Applicant<br>NAGANO, Tomokazu et al                                     |   |

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:  
03 March 2000 (03.03.00)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:  
\_\_\_\_\_

2. The election ☒ was  
☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

|   |                                  |
|---|----------------------------------|
| The International Bureau of WIPO<br>34, chemin des Colombettes<br>1211 Geneva 20, Switzerland | Authorized officer<br>R. Forax   |
| Facsimile No.: (41-22) 740.14.35  | Telephone No.: (41-22) 338.83.38 |

12 T  
09/762188  
Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

|   |   |   |
|---|---|---|
| Applicant's or agent's file reference<br>S-13-PCT   | <b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416) |   |
| International application No.<br>PCT/JP99/04249   | International filing date (day/month/year)<br>04 August 1999 (04.08.99)   | Priority date (day/month/year)<br>05 August 1998 (05.08.98) |
| International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC<br>A61K 38/18, A61P 9/10 |   | <b>RECEIVED</b><br>MAR 29 2001<br>TECH CENTER 1600/2900     |
| Applicant<br>SUMITOMO PHARMACEUTICALS CO., LTD.   |   |   |

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 3 sheets, including this cover sheet.

☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of \_\_\_\_\_ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

|  |  |
|--|--|
| Date of submission of the demand<br>03 March 2000 (03.03.00) | Date of completion of this report<br>02 November 2000 (02.11.2000) |
| Name and mailing address of the IPEA/JP                      | Authorized officer   |
| Facsimile No.  | Telephone No.  |

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/04249

## I. Basis of the report

1. With regard to the **elements** of the international application:\*

- ☒ the international application as originally filed
- ☐ the description:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the claims:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, as amended (together with any statement under Article 19  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the sequence listing part of the description:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language \_\_\_\_\_ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages \_\_\_\_\_
- ☐ the claims, Nos. \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).\*\*

\* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

\*\* Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/04249

**V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement****1. Statement**

|                               |        |      |     |
|-------------------------------|--------|------|-----|
| Novelty (N)                   | Claims |      | YES |
|                               | Claims | 1-15 | NO  |
| Inventive step (IS)           | Claims |      | YES |
|                               | Claims | 1-15 | NO  |
| Industrial applicability (IA) | Claims | 1-15 | YES |
|                               | Claims |      | NO  |

**2. Citations and explanations**

Document 1 [Takahiro Yamaguchi et al., "Examination of efficacy of using hepatocyte growth factor together with laser surgery for regenerating deficient cardiac muscle in the treatment of chronic ischemic disease," Japanese Circulation Journal, Vol. 62, Supplement I, Feb. 1998, p. 407, P089], document 2 [JP, 7-300426, A (Snow Brand Milk Products Co., Ltd.) 14 November 1995 (14.11.95) & WO, 95/29694, A1 & EP, 784980, A1 & US, 5840311, A], Claims; Par. Nos. 0008, 0009, and 0013, document 3 [JP, 8-295634, A (Sumitomo Pharmaceuticals Co., Ltd.) 12 November 1996 (12.11.96) Claims; Par. No. 0014 (Family: none)], document 4 [JP, 5-97694, A (Denki Kagaku Kogyo Ltd.) 20 April 1993 (20.04.93) Claim 3; Par. Nos. 0010, 0036 (Family: none)], document 5 [WO, 93/03061, A1 (Toray Industries Inc.) 18 February 1993 (18.02.93) & EP, 550769, A1]] Claims; page 29, line 19 to page 30, line 3, and document 6 [JP, 6-340546, A (Toshikazu Nakamura) 13 December 1994 (13.12.94) & WO, 93/08821, A1 & EP, 724884, A1] Claims; Par. No. 0012 cited in the international search report describe pharmaceutical products that have hepatic growth factor (HGF) as the active ingredient and that distribute an effective amount of this growth factor to tissues at a local site of administration and their surrounding tissues. Documents 1-3 further state that the pharmaceutical products are used especially for the treatment of ischemic diseases of the heart and limbs, and for arterial disease. Therefore, the subject matter of Claims 1-15 does not appear to be novel.

# PCT

## REQUEST

The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty.

For receiving Office use only

International Application No.

International Filing Date

Name of receiving Office and "PCT International Application"

Applicant's or agent's file reference  
(if desired) (12 characters maximum) S-13-PCT

|  |  |
|--|--|
| <b>Box No. I TITLE OF INVENTION</b><br>PREPARATIONS FOR ADMINISTRATION OF HEPATOCYTE GROWTH FACTOR   |  |
| <b>Box No. II APPLICANT</b><br><div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 65%;"> <p>Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)</p> <p>Sumitomo Pharmaceuticals Co., Ltd.</p> <p>2-8, Doshomachi 2-chome, Chuo-ku, Osaka-shi, Osaka 541-8510 Japan</p> </div> <div style="width: 30%;"> <p><input type="checkbox"/> This person is also inventor.</p> <p>Telephone No.</p> <p>Facsimile No.</p> <p>Teleprinter No.</p> </div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between; margin-top: 10px;"> <p>State (that is, country) of nationality: JAPAN</p> <p>State (that is, country) of residence: JAPAN</p> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between; margin-top: 5px;"> <p>This person is applicant for the purposes of: <input type="checkbox"/> all designated States <input checked="" type="checkbox"/> all designated States except the United States of America <input type="checkbox"/> the United States of America only <input type="checkbox"/> the States indicated in the Supplemental Box</p> </div>  |  |
| <b>Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)</b><br><div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 65%;"> <p>Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)</p> <p>NAGANO Tomokazu</p> <p>c/o Sumitomo Pharmaceuticals Co., Ltd.,<br/>1-98, Kasugadenaka 3-chome, Konohana-ku, Osaka-shi, Osaka 554-0022 Japan</p> </div> <div style="width: 30%;"> <p>This person is:</p> <p><input type="checkbox"/> applicant only</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> applicant and inventor</p> <p><input type="checkbox"/> inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)</p> </div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between; margin-top: 10px;"> <p>State (that is, country) of nationality: JAPAN</p> <p>State (that is, country) of residence: JAPAN</p> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between; margin-top: 5px;"> <p>This person is applicant for the purposes of: <input type="checkbox"/> all designated States <input type="checkbox"/> all designated States except the United States of America <input checked="" type="checkbox"/> the United States of America only <input type="checkbox"/> the States indicated in the Supplemental Box</p> </div> <p><input checked="" type="checkbox"/> Further applicants and/or (further) inventors are indicated on a continuation sheet.</p> |  |
| <b>Box No. IV AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE; OR ADDRESS FOR CORRESPONDENCE</b><br><p>The person identified below is hereby/has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as: <input checked="" type="checkbox"/> agent <input type="checkbox"/> common representative</p> <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 65%;"> <p>Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)</p> <p>8548 Patent Attorney HIROSE Takayoshi</p> <p>Takahashi Bldg. Kita-sangokan 6th Floor,<br/>13-3, Nishitenma 5-chome, Kita-ku, Osaka-shi, Osaka 530-0047 Japan</p> </div> <div style="width: 30%;"> <p>Telephone No.<br/>06-6315-8021</p> <p>Facsimile No.<br/>06-6315-8025</p> <p>Teleprinter No.</p> </div> </div> <p><input type="checkbox"/> Address for correspondence: Mark this check-box where no agent or common representative is/has been appointed and the space above is used instead to indicate a special address to which correspondence should be sent.</p>   |  |

Continuation of Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)

If none of the following sub-boxes is used, this sheet should not be included in the request.

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

KUDO Ikue  
c/o Sumitomo Pharmaceuticals Co., Ltd.,  
11, Kanda-surugadai 3-chome, Chiyoda-ku,  
Tokyo 101-8319 Japan

This person is:

- ☐ applicant only  
☒ applicant and inventor  
☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

State (that is, country) of nationality:

JAPAN

State (that is, country) of residence:

JAPAN

This person is applicant for the purposes of:

- ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

KAWAMURA Takao  
c/o Sumitomo Pharmaceuticals Co., Ltd.,  
1-98, Kasugadenaka 3-chome, Konohana-ku,  
Osaka-shi, Osaka 554-0022 Japan

This person is:

- ☐ applicant only  
☒ applicant and inventor  
☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

State (that is, country) of nationality:

JAPAN

State (that is, country) of residence:

JAPAN

This person is applicant for the purposes of:

- ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

TAIJI Mutsuo  
c/o Sumitomo Pharmaceuticals Co., Ltd.,  
1-98, Kasugadenaka 3-chome, Konohana-ku,  
Osaka-shi, Osaka 554-0022 Japan

This person is:

- ☐ applicant only  
☒ applicant and inventor  
☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

State (that is, country) of nationality:

JAPAN

State (that is, country) of residence:

JAPAN

This person is applicant for the purposes of:

- ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

NOGUCHI Hiroshi  
c/o Sumitomo Pharmaceuticals Co., Ltd.,  
11, Kanda-surugadai 3-chome, Chiyoda-ku,  
Tokyo 101-8319 Japan

This person is:

- ☐ applicant only  
☒ applicant and inventor  
☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

State (that is, country) of nationality:

JAPAN

State (that is, country) of residence:

JAPAN

This person is applicant for the purposes of:

- ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

☒ Further applicants and/or (further) inventors are indicated on another continuation sheet.

Continuation of Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)

If none of the following sub-boxes is used, this sheet should not be included in the request

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

TANI Shunsuke

c/o Sumitomo Pharmaceuticals Co., Ltd.,  
2-8, Doshomachi 2-chome, Chuo-ku, Osaka-shi,  
Osaka 541-8510 Japan

This person is:

- ☐ applicant only  
☒ applicant and inventor  
☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

State (that is, country) of nationality:

JAPAN

State (that is, country) of residence:

JAPAN

This person is applicant for the purposes of:

- ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

MAEDA Hiroo

c/o Sumitomo Pharmaceuticals Co., Ltd.,  
3-45, Kurakakiuchi 1-chome, Ibaraki-shi,  
Osaka 567-0878 Japan

This person is:

- ☐ applicant only  
☒ applicant and inventor  
☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

State (that is, country) of nationality:

JAPAN

State (that is, country) of residence:

JAPAN

This person is applicant for the purposes of:

- ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

This person is:

- ☐ applicant only  
☐ applicant and inventor  
☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

State (that is, country) of nationality:

State (that is, country) of residence:

This person is applicant for the purposes of:

- ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

This person is:

- ☐ applicant only  
☐ applicant and inventor  
☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

State (that is, country) of nationality:

State (that is, country) of residence:

This person is applicant for the purposes of:

- ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

☐ Further applicants and/or (further) inventors are indicated on another continuation sheet.

**Box No.V DESIGNATION OF STATES**

The following designations are hereby made under Rule 4.9(a) (mark the applicable check-boxes; at least one must be marked):

**Regional Patent**

- ☒ **AP ARIPO Patent:** GH Ghana, GM Gambia, KE Kenya, LS Lesotho, MW Malawi, SD Sudan, SL Sierra Leone, SZ Swaziland, UG Uganda, ZW Zimbabwe, and any other State which is a Contracting State of the Harare Protocol and of the PCT
- ☒ **EA Eurasian Patent:** AM Armenia, AZ Azerbaijan, BY Belarus, KG Kyrgyzstan, KZ Kazakhstan, MD Republic of Moldova, RU Russian Federation, TJ Tajikistan, TM Turkmenistan, and any other State which is a Contracting State of the Eurasian Patent Convention and of the PCT
- ☒ **EP European Patent:** AT Austria, BE Belgium, CH and LI Switzerland and Liechtenstein, CY Cyprus, DE Germany, DK Denmark, ES Spain, FI Finland, FR France, GB United Kingdom, GR Greece, IE Ireland, IT Italy, LU Luxembourg, MC Monaco, NL Netherlands, PT Portugal, SE Sweden, and any other State which is a Contracting State of the European Patent Convention and of the PCT
- ☒ **OA OAPI Patent:** BF Burkina Faso, BJ Benin, CF Central African Republic, CG Congo, CI Côte d'Ivoire, CM Cameroon, GA Gabon, GN Guinea, GW Guinea-Bissau, ML Mali, MR Mauritania, NE Niger, SN Senegal, TD Chad, TG Togo, and any other State which is a member State of OAPI and a Contracting State of the PCT (if other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line)

National Patent (if other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line):

- |  |  |
|--|--|
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>AE</b> United Arab Emirates                 | <input checked="" type="checkbox"/> <b>LR</b> Liberia  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>AL</b> Albania                              | <input checked="" type="checkbox"/> <b>LS</b> Lesotho  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>AM</b> Armenia                              | <input checked="" type="checkbox"/> <b>LT</b> Lithuania  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>AT</b> Austria                              | <input checked="" type="checkbox"/> <b>LU</b> Luxembourg   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>AU</b> Australia                            | <input checked="" type="checkbox"/> <b>LV</b> Latvia   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>AZ</b> Azerbaijan                           | <input checked="" type="checkbox"/> <b>MD</b> Republic of Moldova  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>BA</b> Bosnia and Herzegovina               | <input checked="" type="checkbox"/> <b>MG</b> Madagascar   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>BB</b> Barbados                             | <input checked="" type="checkbox"/> <b>MK</b> The former Yugoslav Republic of Macedonia                      |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>BG</b> Bulgaria                             |  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>BR</b> Brazil                               | <input checked="" type="checkbox"/> <b>MN</b> Mongolia   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>BY</b> Belarus                              | <input checked="" type="checkbox"/> <b>MW</b> Malawi   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>CA</b> Canada                               | <input checked="" type="checkbox"/> <b>MX</b> Mexico   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>CH and LI</b> Switzerland and Liechtenstein | <input checked="" type="checkbox"/> <b>NO</b> Norway   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>CN</b> China                                | <input checked="" type="checkbox"/> <b>NZ</b> New Zealand  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>CU</b> Cuba                                 | <input checked="" type="checkbox"/> <b>PL</b> Poland   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>CZ</b> Czech Republic                       | <input checked="" type="checkbox"/> <b>PT</b> Portugal   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>DE</b> Germany                              | <input checked="" type="checkbox"/> <b>RO</b> Romania  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>DK</b> Denmark                              | <input checked="" type="checkbox"/> <b>RU</b> Russian Federation   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>EE</b> Estonia                              | <input checked="" type="checkbox"/> <b>SD</b> Sudan  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>ES</b> Spain                                | <input checked="" type="checkbox"/> <b>SE</b> Sweden   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>FI</b> Finland                              | <input checked="" type="checkbox"/> <b>SG</b> Singapore  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>GB</b> United Kingdom                       | <input checked="" type="checkbox"/> <b>SI</b> Slovenia   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>GD</b> Grenada                              | <input checked="" type="checkbox"/> <b>SK</b> Slovakia   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>GE</b> Georgia                              | <input checked="" type="checkbox"/> <b>SL</b> Sierra Leone   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>GH</b> Ghana                                | <input checked="" type="checkbox"/> <b>TJ</b> Tajikistan   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>GM</b> Gambia                               | <input checked="" type="checkbox"/> <b>TM</b> Turkmenistan   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>HR</b> Croatia                              | <input checked="" type="checkbox"/> <b>TR</b> Turkey   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>HU</b> Hungary                              | <input checked="" type="checkbox"/> <b>TT</b> Trinidad and Tobago  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>ID</b> Indonesia                            | <input checked="" type="checkbox"/> <b>UA</b> Ukraine  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>IL</b> Israel                               | <input checked="" type="checkbox"/> <b>UG</b> Uganda   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>IN</b> India                                | <input checked="" type="checkbox"/> <b>US</b> United States of America                                       |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>IS</b> Iceland                              |  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>JP</b> Japan                                | <input checked="" type="checkbox"/> <b>UZ</b> Uzbekistan   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>KE</b> Kenya                                | <input checked="" type="checkbox"/> <b>VN</b> Viet Nam   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>KG</b> Kyrgyzstan                           | <input checked="" type="checkbox"/> <b>YU</b> Yugoslavia   |
| <input type="checkbox"/> <b>KP</b> Democratic People's Republic of Korea           | <input checked="" type="checkbox"/> <b>ZA</b> South Africa   |
|  | <input checked="" type="checkbox"/> <b>ZW</b> Zimbabwe   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>KR</b> Republic of Korea                    | Check-boxes reserved for designating States which have become party to the PCT after issuance of this sheet: |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>KZ</b> Kazakhstan                           | <input type="checkbox"/>   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>LC</b> Saint Lucia                          | <input type="checkbox"/>   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>LK</b> Sri Lanka                            | <input type="checkbox"/>   |

**Precautionary Designation Statement:** In addition to the designations made above, the applicant also makes under Rule 4.9(b) all other designations which would be permitted under the PCT except any designation(s) indicated in the Supplemental Box as being excluded from the scope of this statement. The applicant declares that those additional designations are subject to confirmation and that any designation which is not confirmed before the expiration of 15 months from the priority date is to be regarded as withdrawn by the applicant at the expiration of that time limit. (Confirmation of a designation consists of the filing of a notice specifying that designation and the payment of the designation and confirmation fees. Confirmation must reach the receiving Office within the 15-month time limit.)



| <b>Box No. VI PRIORITY CLAIM</b>   |  |   |  |  | <input type="checkbox"/> Further priority claims are indicated in the Supplemental Box. |  |  |  |  |
|--|--|---|--|--|---|--|--|--|--|
| Filing date<br>of earlier application<br>(day/month/year)  |  | Number<br>of earlier application                |  | Where earlier application is:  |   |  |  |  |  |
|  |  |   |  | national application:<br>country   | regional application:*<br>regional Office   | international application:<br>receiving Office |  |  |  |
| item (1)<br>05. 08. 98   |  | Japanese Patent<br>Application No.<br>10/222170 |  | JAPAN  |   |  |  |  |  |
| item (2)<br>13. 01. 99   |  | Japanese Patent<br>Application No.<br>11/6261   |  | JAPAN  |   |  |  |  |  |
| item (3)   |  |   |  |  |   |  |  |  |  |
| <input type="checkbox"/> The receiving Office is requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) (only if the earlier application was filed with the Office which for the purposes of the present international application is the receiving Office) identified above as item(s): |  |   |  |  |   |  |  |  |  |
| <small>* Where the earlier application is an ARIPO application, it is mandatory to indicate in the Supplemental Box at least one country party to the Paris Convention for the Protection of Industrial Property for which that earlier application was filed (Rule 4.10(b)(ii)). See Supplemental Box.</small>                                |  |   |  |  |   |  |  |  |  |
| <b>Box No. VII INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY</b>   |  |   |  |  |   |  |  |  |  |
| <b>Choice of International Searching Authority (ISA)</b><br><small>(if two or more International Searching Authorities are competent to carry out the international search, indicate the Authority chosen; the two-letter code may be used):</small>   |  |   |  | <b>Request to use results of earlier search; reference to that search</b> (if an earlier search has been carried out by or requested from the International Searching Authority):  |   |  |  |  |  |
| ISA / JP   |  |   |  | Date (day/month/year)      Number      Country (or regional Office)  |   |  |  |  |  |
| <b>Box No. VIII CHECK LIST; LANGUAGE OF FILING</b>   |  |   |  |  |   |  |  |  |  |
| This international application contains the following <b>number of sheets</b> :<br>request : 5<br>description (excluding sequence listing part) : 24<br>claims : 2<br>abstract : 1<br>drawings : 7<br>sequence listing part of description : 0<br><b>Total number of sheets : 39</b>   |  |   |  | This international application is <b>accompanied by</b> the item(s) marked below:<br>1. <input checked="" type="checkbox"/> fee calculation sheet<br>2. <input checked="" type="checkbox"/> separate signed power of attorney<br>3. <input type="checkbox"/> copy of general power of attorney; reference number, if any:<br>4. <input type="checkbox"/> statement explaining lack of signature<br>5. <input type="checkbox"/> priority document(s) identified in Box No. VI as item(s):<br>6. <input type="checkbox"/> translation of international application into (language):<br>7. <input type="checkbox"/> separate indications concerning deposited microorganism or other biological material<br>8. <input type="checkbox"/> nucleotide and/or amino acid sequence listing in computer readable form<br>9. <input type="checkbox"/> other (specify): |   |  |  |  |  |
| <b>Figure of the drawings</b> which should accompany the abstract:   |  |   |  | <b>Language of filing</b> of the international application:  |   |  |  |  |  |
| <b>Box No. IX SIGNATURE OF APPLICANT OR AGENT</b>  |  |   |  |  |   |  |  |  |  |
| <small>Next to each signature, indicate the name of the person signing and the capacity in which the person signs (if such capacity is not obvious from reading the request).</small>  |  |   |  |  |   |  |  |  |  |
| Takayoshi Hirose (seal)  |  |   |  |  |   |  |  |  |  |

|   |  |
|---|--|
| For receiving Office use only   |  |
| 1. Date of actual receipt of the purported international application:   | 2. Drawings:<br><br><input type="checkbox"/> received:<br><br><input type="checkbox"/> not received: |
| 3. Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application: |  |
| 4. Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2):  |  |
| 5. International Searching Authority (if two or more are competent): ISA /  |  |
| 6. <input type="checkbox"/> Transmittal of search copy delayed until search fee is paid.  |  |

|   |
|---|
| For International Bureau use only                               |
| Date of receipt of the record copy by the International Bureau: |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/04249

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>6</sup> A61K38/18

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>6</sup> A61K38/18

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
CAPLUS (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No.            |
|-----------|---|----------------------------------|
| X         | Takahiro Yamaguchi et al., "Examination on effect of using Hepatocyte Growth Factor, together with laser operations for reproducing defected parts of cardiac muscles, for treatment of chronic ischemic diseases", Japanese Circulation Journal, Feb 1998, Vol.62, Supplement I, p.407, P089 | 1-15                             |
| X         | JP, 7-300426, A (Snow Brand Milk Products Co., Ltd.), 14 November, 1995 (14.11.95),<br>Claims; [0008], [0009], [0013]<br>& WO, 95/29694, A1 & EP, 784980, A1<br>& US, 5840311, A  | 1-15                             |
| X         | JP, 8-295634, A (Sumitomo Pharmaceuticals Co., Ltd.), 12 November, 1996 (12.11.96),<br>Claim; [0011], (family: none)  | 1-15                             |
| X<br>Y    | JP, 5-97694, A (Denki Kagaku Kogyo Ltd.),<br>20 April, 1993 (20.04.93),<br>Claims; [0003], [0010], [0036], (Family: none)   | 1-8, 11, 12, 15<br>9, 10, 13, 14 |

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
08 November, 1999 (08.11.99)Date of mailing of the international search report  
16 November, 1999 (16.11.99)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/04249

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No.      |
|-----------|---|----------------------------|
| X<br>Y    | WO, 93/03061, A1 (Toray Industries Inc.)<br>18 February, 1993 (18.02.93)<br>Claim; page 29, line 19 to page 30, line 3<br>& EP, 550769, A1  | 1-8,11,12,15<br>9,10,13,14 |
| X<br>Y    | JP, 6-340546, A (toshikazu Nakamura),<br>13 December, 1994 (13.12.94)<br>Claim; [0012]<br>& WO, 93/08821, A1 & EP, 724884, A1   | 1-8,11,12,15<br>9,10,13,14 |
| Y         | Van BELLE, Eric et al, Potentiated Angiogenic Effect of<br>Scatter Factor/Hepatocyte Growth Factor via Induction of<br>Vascular Endothelial Growth Factor, Circulation, May 1998,<br>Vol.97, No.4, pp.381-390, Abstract, Discussion | 9,10,13,14                 |



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

|   |  |  |
|---|--|--|
| <p>(51) 国際特許分類6<br/>A61K 38/18</p>  | <p>A1</p>  | <p>(11) 国際公開番号<br/>WO00/07615</p> <p>(43) 国際公開日<br/>2000年2月17日(17.02.00)</p> |
| <p>(21) 国際出願番号<br/>PCT/JP99/04249</p> <p>(22) 国際出願日<br/>1999年8月4日(04.08.99)</p> <p>(30) 優先権データ<br/>特願平10/222170 1998年8月5日(05.08.98) JP<br/>特願平11/6261 1999年1月13日(13.01.99) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について)<br/>住友製薬株式会社<br/>(SUMITOMO PHARMACEUTICALS CO., LTD.)(JP/JP)<br/>〒541-8510 大阪府大阪市中央区道修町2丁目2番8号 Osaka, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および<br/>(75) 発明者 / 出願人 (米国についてののみ)<br/>永野智一(NAGANO, Tomokazu)(JP/JP)<br/>河村敬夫(KAWAMURA, Takao)(JP/JP)<br/>泰地睦夫(TAJI, Mutsuo)(JP/JP)<br/>〒554-0022 大阪府大阪市此花区春日出中3丁目1番98号<br/>住友製薬株式会社内 Osaka, (JP)<br/>宮東育枝(KUDO, Ikue)(JP/JP)<br/>野口 浩(NOGUCHI, Hiroshi)(JP/JP)<br/>〒101-8319 東京都千代田区神田駿河台3丁目11番地<br/>住友製薬株式会社内 Tokyo, (JP)</p> | <p>谷 俊輔(TANI, Shunsuke)(JP/JP)<br/>〒541-8510 大阪府大阪市中央区道修町2丁目2番8号<br/>住友製薬株式会社内 Osaka, (JP)<br/>前田弘雄(MAEDA, Hiroo)(JP/JP)<br/>〒567-0878 大阪府茨木市蔵垣内1丁目3番45号<br/>住友製薬株式会社内 Osaka, (JP)</p> <p>(74) 代理人<br/>弁理士 廣瀬孝美(HIROSE, Takayoshi)<br/>〒530-0047 大阪府大阪市北区西天満5丁目13番3号<br/>高橋ビル北3号館6階 Osaka, (JP)</p> <p>(81) 指定国 AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM)</p> <p>添付公開書類<br/>国際調査報告書</p> |  |
| <p>(54)Title: PREPARATIONS FOR THE ADMINISTRATION OF HEPATOCYTE GROWTH FACTOR</p> <p>(54)発明の名称 肝実質細胞増殖因子投与用製剤</p> <p>(57) Abstract<br/>Preparations to be administered for treating or preventing ischemic diseases or arterial diseases which contain hepatocyte growth factor (HGF) as the active ingredient. Compared with intravenous administration, these preparations are advantageous in that the HGF concentration can be maintained at the affected part to which HGF has been administered and thus the half-life can be prolonged and the administration dose can be reduced; and they exert the effect almost exclusively on the affected part.</p>              |  |  |

(57)要約

肝実質細胞増殖因子（HGF）を有効成分として含有し、虚血性疾患あるいは動脈疾患を治療又は予防するための投与用製剤。

静脈内投与と比較してHGFが投与された患部のHGF濃度が維持され半減期が長く、投与量が低減でき、また患部以外への作用が少ないという効果を有する。

PCTに基づいて公開される国際出願のパフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

|                 |            |                   |               |
|-----------------|------------|-------------------|---------------|
| AE アラブ首長国連邦     | DM ドミニカ    | KZ カザフスタン         | RU ロシア        |
| AL アルバニア        | EE エストニア   | LC セントルシア         | SD スーダン       |
| AM アルメニア        | ES スペイン    | LI リヒテンシュタイン      | SE スウェーデン     |
| AT オーストリア       | FI フィンランド  | LK スリ・ランカ         | SG シンガポール     |
| AU オーストラリア      | FR フランス    | LR リベリア           | SI スロヴェニア     |
| AZ アゼルバイジャン     | GA ガボン     | LS レソト            | SK スロヴァキア     |
| BA ボスニア・ヘルツェゴビナ | GB 英国      | LT リトアニア          | SL シエラ・レオネ    |
| BB バルバドス        | GD グレナダ    | LU ルクセンブルグ        | SN セネガル       |
| BE ベルギー         | GE グルジア    | LV ラトヴィア          | SZ スワジランド     |
| BF ブルキナ・ファソ     | GH ガーナ     | MA モロッコ           | TD チャード       |
| BG ブルガリア        | GM ガンビア    | MC モナコ            | TG トーゴ        |
| BJ ベナン          | GN ギニア     | MD モルドヴァ          | TJ タジキスタン     |
| BR ブラジル         | GW ギニア・ビサウ | MG マダガスカル         | TZ タンザニア      |
| BY ベラルーシ        | GR ギリシャ    | MK マケドニア旧ユーゴスラヴィア | TM トルクメニスタン   |
| CA カナダ          | HR クロアチア   |                   | TR トルコ        |
| CF 中央アフリカ       | HU ハンガリー   | ML モンゴル           | TT トリニダード・トバゴ |
| CG コンゴ          | ID インドネシア  | MN モンゴリア          | UA ウクライナ      |
| CH スイス          | IE アイルランド  | MR モーリタニア         | UG ウガンダ       |
| CI コートジボアール     | IL イスラエル   | MW マラウイ           | US 米国         |
| CM カメルーン        | IN インド     | MX メキシコ           | UZ ウズベキスタン    |
| CN 中国           | IS アイスランド  | NE ニジェール          | VN ヴイエトナム     |
| CR コスタ・リカ       | IT イタリア    | NL オランダ           | YU ユーゴスラビア    |
| CU キューバ         | JP 日本      | NO ノールウェー         | ZA 南アフリカ共和国   |
| CY キプロス         | KE ケニア     | NZ ニュー・ジーズランド     | ZW ジンバブエ      |
| CZ チェッコ         | KG キルギスタン  | PL ポーランド          |               |
| DE ドイツ          | KP 北朝鮮     | PT ポルトガル          |               |
| DK デンマーク        | KR 韓国      | RO ルーマニア          |               |

PCT

## 国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)  
[PCT36条及びPCT規則70]

REC'D 17 NOV 2000

WIPO

PCT

|   |   |                         |
|---|---|-------------------------|
| 出願人又は代理人<br>の書類記号 S-13-PCT                              | 今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知(様式PCT/<br>IPEA/416)を参照すること。 |                         |
| 国際出願番号<br>PCT/J P 99/04249                              | 国際出願日<br>(日.月.年) 04.08.99                             | 優先日<br>(日.月.年) 05.08.98 |
| 国際特許分類(IPC)<br>Int. Cl <sup>7</sup> A61K38/18, A61P9/10 |   |                         |
| 出願人(氏名又は名称)<br>住友製薬株式会社                                 |   |                         |


1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条(PCT36条)の規定に従い送付する。

2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 3 ページからなる。

- ☐ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。  
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)  
この附属書類は、全部で ページである。

3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。

- I ☒ 国際予備審査報告の基礎
- II ☐ 優先権
- III ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
- IV ☐ 発明の単一性の欠如
- V ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
- VI ☐ ある種の引用文献
- VII ☐ 国際出願の不備
- VIII ☐ 国際出願に対する意見

|  |   |         |
|--|---|---------|
| 国際予備審査の請求書を受理した日<br>03.03.00                                     | 国際予備審査報告を作成した日<br>02.11.00  |         |
| 名称及びあて先<br>日本国特許庁(IPEA/J P)<br>郵便番号100-8915<br>東京都千代田区霞が関三丁目4番3号 | 特許庁審査官(権限のある職員)<br>瀬下 浩  | 4C 9284 |
| 電話番号 03-3581-1101 内線 3452  |   |         |

## I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に  
 応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。  
 PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- ☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 出願時に提出されたもの  
 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 出願時に提出されたもの  
 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 PCT19条の規定に基づき補正されたもの  
 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 出願時に提出されたもの  
 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 出願時に提出されたもの  
 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である \_\_\_\_\_ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語  
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語  
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表  
☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった  
☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ  
☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項  
☐ 図面 図面の第 \_\_\_\_\_ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条（PCT35条(2)）に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

|                |       |      |   |
|----------------|-------|------|---|
| 新規性 (N)        | 請求の範囲 |      | 有 |
|                | 請求の範囲 | 1-15 | 無 |
| 進歩性 (IS)       | 請求の範囲 |      | 有 |
|                | 請求の範囲 | 1-15 | 無 |
| 産業上の利用可能性 (IA) | 請求の範囲 | 1-15 | 有 |
|                | 請求の範囲 |      | 無 |

2. 文献及び説明 (PCT規則70.7)

請求の範囲1-15は、文献1（山口 高広 等、「慢性虚血心筋に対するレーザー心筋内欠陥新生術におけるHepatocyte Growth Factor併用効果の検討」、Japanese Circulation Journal, Feb 1998, Vol.62, Supplement I, p.407, P089）、文献2（JP, 7-300426, A（雪印乳業株式会社）14.11月.1995（14.11.95）&WO, 95/29694, A1&EP, 784980, A1&US, 5840311, A）の特許請求の範囲、【0008】、【0009】、【0013】、文献3（JP, 8-295634, A（住友製薬株式会社）12.11月.1996（12.11.96）ファミリーなし）の特許請求の範囲、【0014】、文献4（JP, 5-97694, A（電気化学工業株式会社）20.4月.1993（20.04.93）ファミリーなし）の【請求項3】、【0010】、【0036】、文献5（WO, 93/03061, A1（東レ株式会社）18.2月.1993（18.02.1993）&EP, 550769, A1）の請求の範囲、第29ページ第19行-第30ページ第3行、文献6（JP, 6-340546, A（中村 敏一）13.12月.1994（13.12.94）&WO, 93/08821, A1&EP, 724884, A1）の特許請求の範囲、【0012】に、肝実質細胞増殖因子（HGF）を有効成分とし、投与部位局所の組織及びその近傍組織に有効量の該因子を移行・分布・作用させる製剤が記載されており、特に、文献1-3には、心臓又は四肢の虚血性疾患または動脈疾患を治療するためのものが記載されているから、新規性を有しない。



PCT

E P



国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)  
[PCT18条、PCT規則43、44]

|                             |   |                         |
|-----------------------------|---|-------------------------|
| 出願人又は代理人<br>の書類記号 S-13-PCT  | 今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)及び下記5を参照すること。 |                         |
| 国際出願番号<br>PCT/JP99/04249    | 国際出願日<br>(日.月.年) 04.08.99                           | 優先日<br>(日.月.年) 05.08.98 |
| 出願人(氏名又は名称)<br><br>住友製薬株式会社 |   |                         |

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。  
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

#### 1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 \_\_\_\_\_ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.<sup>6</sup> A61K38/18

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.<sup>6</sup> A61K38/18

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS (STN)

## C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の<br>カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示   | 関連する<br>請求の範囲の番号 |
|-----------------|---|------------------|
| X               | 山口 高広 等、「慢性虚血心筋に対するレーザー心筋内欠陥新生術におけるHepatocyte Growth Factor併用効果の検討」、Japanese Circulation Journal, Feb 1998, Vol.62, Supplement I, p.407, P089 | 1-15             |
| X               | J P, 7-300426, A (雪印乳業株式会社) 14. 11月. 1995 (14. 11. 95) 特許請求の範囲、【0008】、【0009】、【0013】<br>&WO, 95/29694, A1 &EP, 784980, A1<br>&US, 5840311, A   | 1-15             |

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

08. 11. 99

国際調査報告の発送日

16.11.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

滝原 下 浩一



4 C

9284

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

## C (続き) . 関連すると認められる文献

| 引用文献の<br>カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示  | 関連する<br>請求の範囲の番号                 |
|-----------------|--|----------------------------------|
| X               | J P, 8-295634, A (住友製薬株式会社) 12. 11月.<br>1996 (12. 11. 96) 特許請求の範囲、【0011】<br>ファミリーなし  | 1-15                             |
| X<br>Y          | J P, 5-97694, A (電気化学工業株式会社) 20. 4月.<br>1993 (20. 04. 93) 【請求項3】、【0010】、<br>【0036】<br>ファミリーなし  | 1-8, 11, 12, 15<br>9, 10, 13, 14 |
| X<br>Y          | WO, 93/03061, A1 (東レ株式会社) 18. 2月.<br>1993 (18. 02. 93) 請求の範囲、第29ページ第19行<br>-第30ページ第3行<br>& EP, 550769, A1  | 1-8, 11, 12, 15<br>9, 10, 13, 14 |
| X<br>Y          | J P, 6-340546, A (中村 敏一) 13. 12月.<br>1994 (13. 12. 94) 特許請求の範囲、【0012】<br>& WO, 93/08821, A1 & EP, 724884, A1   | 1-8, 11, 12, 15<br>9, 10, 13, 14 |
| Y               | Van BELLE, Eric et al, Potentiated Angiogenic Effect of<br>Scatter Factor/Hepatocyte Growth Factor via Induction of<br>Vascular Endothelial Growth Factor, Circulation, May 1998,<br>Vol. 97, No. 4, pp. 381-390, Abstract, Discussion | 9, 10, 13, 14                    |

## 明 細 書

## 肝実質細胞増殖因子投与用製剤

## 5 技術分野

本発明は、肝実質細胞増殖因子（HGF）を有効成分として含有し、虚血性疾患又は動脈疾患を治療又は予防するための投与用製剤に関する。さらに詳しくは、心臓または四肢の虚血性疾患または動脈疾患を治療又は予防するために、患部及びその周辺の筋肉局所部位に投与することからなる筋肉内投与用製剤などに関する。

10

## 背景技術

肝実質細胞増殖因子（HGF）は成熟肝細胞に対する強力な増殖促進因子として発見され、その遺伝子クローニングがなされたタンパク質である（Biochem Biophys Res Commun, 122, 1450 (1984)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 6489, (1986)、FEBS Letter, 22, 231 (1987)、Nature, 342, 440 (1989)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 3200 (1991)）。その後の研究により、HGFはin vivoにおいて肝再生因子として障害肝の修復再生に働くだけでなく、血管新生作用を有し、虚血性疾患や動脈疾患の治療または予防に大きな役割を果たしていることが明らかとなってきた（Symp. Soc. Exp. Biol., 47 cell behavior, 227-234 (1993)、Proc. Natl. Acad. Sci., 90, 1937-1941 (1993)、Circulation, 97, 381-390 (1998)）。すなわち、ウサギの下肢虚血モデルにおいてHGFを投与すると、顕著な血管新生が見られ  
25 血流量の改善、血圧減少の抑制、虚血症状の改善が生じたとの報告がなされている。これらの報告により、今日では、血管新生因子の一つとしてHGFが発現、機能していると考えられるようになった。

このようにHGFは血管新生因子の機能を始めとして種々の機能を持っており、医薬品として活用するための色々な試みがなされてきた。しかし、ここで問題となってきたのがHGFの血中での半減期である。HGFの半減期は約10分と短く、血中濃度を維持することが困難であり、また、HGF有効量の患部への移行性が問題となった。

一般的にタンパク性製剤の場合は静脈内への投与の多いことが常識となっており、前記虚血性疾患モデルに対するHGFの投与に関しても、例えば静脈や動脈内への投与の例が示されている（Circulation, 97, 381-390 (1998)）。このような動物モデルに対する静脈あるいは動脈内投与により、虚血性疾患あるいは動脈疾患に対するHGFの有効性が明らかにされているものの、具体的なHGFの有効な投与方法あるいは投与量等については、未だ結論が出されていない。特にHGFの場合は、前記のような半減期の問題、患部への移行性の問題もあり、HGFの有効な投与方法あるいは投与量等については、未だ結論が出されていない。

本発明は、HGFを有効成分として含有し、虚血性疾患または動脈疾患を治療又は予防するための投与用製剤を提供することを目的とする。さらに詳しくは、心臓又は四肢の虚血性疾患又は動脈疾患を治療又は予防するために、患部及びその周辺の筋肉局所部位に投与することからなる筋肉内投与用製剤などに関する。本発明の筋肉内投与用製剤は、例えば障害部位である心臓、四肢の虚血部位の筋肉内に直接投与されるものであり、投与されたHGFの利用効率が極めて高く、静脈内投与と比較して投与量が低減できる。さらに、投与部位である筋肉から、血液中、投与部位の筋肉組織及びその周辺の組織を除いた全身への移行、分布、作用が少ないため、他の部位への作用を軽減でき、より選択性の高いものであるという効果を有する。

本発明者らはHGFを虚血性疾患あるいは動脈疾患に適応するにあたり、投与量、投与方法の検討を鋭意行ってきた。上記疾患に対するHGFの投与方法として、静脈内ボラス投与、静脈内持続投与、皮下投与、腹腔内投与、筋肉内投与などの方法を想定して検討を行ってきた。

前記したように、一般的にタンパク性製剤の場合は静脈内投与の多いことが常識と

なっており、加えて、虚血性疾患及び動脈疾患は血管傷害であることから、血管の内側から薬剤を効かせるのが効果的であるとの常識があった。それゆえ、虚血性疾患モデルや動脈疾患モデルに対するHGFの投与についても、静脈あるいは動脈内への投与の例がほとんどであり、HGFの筋肉内への投与については文献も含めて情報が無く、またHGFの体内動態についても報告を見出すことができなかった。このように、虚血性疾患モデルや動脈疾患モデルに対してHGFの筋肉内投与を試みた報告はなされておらず、従ってHGFの筋肉内投与が有効であるか否かについては、今まで全く明らかにされていなかった。

本発明者らはラットを用いて、下肢虚血部位に対する筋肉内投与の体内動態と、他の投与経路（静脈内投与）の体内動態とを比較検討した。その結果、筋肉内投与の場合には、静脈内投与した場合と比較し、投与したHGFが投与部位で非常に高い濃度で維持され、血清中及び肝臓や腎臓への移行の低いことが明らかとなった。また、HGFを皮下投与した場合にも、筋肉内投与と同様に投与部位でのHGF濃度が高く維持され、投与部位から循環血中への移行率は低いものであった。

一方、HGFを静脈内投与した場合には、血中のHGF濃度が高く維持されるのに対して、筋肉内におけるHGF濃度は極端に低いことが見出された。このことから、虚血患部及びその周辺の筋肉又はそこに存在する血管にHGFを作用させようとした場合には、静脈内投与では効率が悪く、患部もしくはその周辺の筋肉内に直接投与することが有効であることを、初めて明らかにした。

また、HGFの筋肉内投与と静脈内ボラス投与とを比較したところ、筋肉内投与では、血液、肝臓及び腎臓における最大濃度が静脈内ボラス投与の場合の100分の1以下、より好適には1000分の1以下となることを見出した。さらに、筋肉内投与では、投与部位の筋肉組織内濃度が静脈内ボラス投与の場合の50倍以上、より好適には200倍以上となることを見出された。

さらに、血液、肝臓及び腎臓におけるAUCを筋肉内投与と静脈内ボラス投与とで比較したところ、筋肉内投与では、血液、肝臓及び腎臓におけるAUCが静脈内ボラス投与の5分の1以下、より好適には10分の1以下となることを見出した。さ

らに、投与部位の筋肉組織内AUCは、筋肉内投与では、静脈内ボラス投与の50倍以上、より好適には200倍以上となることが見出された。

以上のように筋肉内投与により、患部の投与部位にHGFが高濃度で維持されることが分かったため、次に、筋肉組織内のHGFが患部の組織や血管に移行して、HGFとしての作用を本当に果たしているか否かを調べた。すなわち、HGFのリセプターであるc-Metのリン酸化が見られるか否かを指標としてHGFの機能を確認した。その結果、30～3000 $\mu$ g/kgのHGFをラット筋肉内に投与した場合、筋肉組織ではHGFの受容体であるc-MetのTyr残基がリン酸化を受け、活性化されていたが、肝臓や腎臓組織では、無処置群と比し、c-Metは全く活性化されていないことが明らかとなった。このことは、投与した筋肉組織においてHGFはその作用を発揮し、肝臓や腎臓においては作用を示さないことを意味している。

以上のようにHGFの作用が確認されたため、本発明者らは実際にHGFの筋肉内投与による有効性を調べるために、閉塞性動脈硬化症(ASO)の動物モデルを用いて検討を行った。即ち、ラット下肢虚血モデルを用いて前記筋肉内投与を行った場合、下肢の虚血障害がどのように改善されるかを検討した。検討方法として、下肢の皮膚表面温度をサーモグラフィーを用いて測定し、皮膚表面温度の低下抑制を指標に筋肉内投与の効果を確認した。その結果、この筋肉内投与により虚血下肢における皮膚表面温度の低下が抑制されることを見出した。これは、HGFが持つ血管新生作用により、虚血下肢の血行動態が改善され温度の低下が抑制されたことを示している。

以上のように、ASOモデルに対するHGFの筋肉内投与の有効性が、初めて明らかとなった。

さらに本発明者らは、ラット下肢虚血ASOモデル及びウサギ下肢虚血ASOモデルを用いて前記筋肉内投与を行い、I/N比(%) (虚血肢血圧/正常肢血圧 $\times$ 100)を調べた。その結果、低投与量・低投与頻度で、I/N比の有意な改善が認められた。これは、HGFが持つ血管新生作用により、虚血肢の血行動態が改善したことを示している。さらに、ウサギモデルについては血管造影も行ったところ、HGF投与群のほうが有意に血管造影スコアの増加率が高かった。これはすなわち、HGFの

作用により側副血行路の発達が促進されたことを示している。また虚血肢関節の硬化度、虚血肢爪先の壊死・脱落および虚血肢下腿部の潰瘍の有無についても併せて調べたところ、HGFの筋肉内投与により改善する傾向が認められた。

5 以上のように、虚血性疾患に対するHGFの筋肉内投与が極めて有効であることが明らかとなった。

上記の実験結果のうち、サーモグラフィーを用いて有効性が確認できたことは、臨床のASO患者、特に軽症の段階から自覚症状として虚血下肢の冷感を持つ患者に対してもHGFの筋肉内投与が有効であることを意味しており、加えてI/N比や血管造影の回復促進、さらには虚血肢の症状の軽減などの改善効果も確認できたことは、  
10 初期のASO患者から、重症なASO患者までこのHGFの筋肉内投与による治療が有効であることを示すものである。このことは、虚血による下肢の切断等が必要になる重症なASOに進行する前に、軽症の段階でASOの治療が出来ることを可能にするものであり、従って本発明の筋肉内投与用製剤は、現在有効な治療方法がまだない大勢の軽症のASO患者にとって、病状の進行を抑制、改善・回復できるという画期的な治療法を提供することができる。しかも、低投与量で効果を示し、また静脈内投  
15 与と比較して患部以外への作用の少ない医薬を提供することができる。

なお、上記のようなHGFの効果をさらに発揮させるためには、コンドロイチン硫酸などの細胞外基質を構成するプロテオグリカン及びそれらを成分として含む蛋白キャリアーを含有しないHGF製剤が望ましいことも明らかとなった。即ち、コラーゲ  
20 ンを基質として作製したミニペレットからのHGFの放出に対するコンドロイチン硫酸配合の影響を検討したところ、コンドロイチン硫酸を配合したHGF含有ミニペレットでは、コンドロイチン硫酸を配合せずアラニンを配合したHGF含有ミニペレットと比較し、ミニペレットからのHGFの放出が速いという結果が得られた。このことは、コンドロイチン硫酸などの細胞外基質を構成するプロテオグリカンを配合しない  
25 いHGF製剤の方が、HGFの放出が遅いことを示している。このことは上記のように、コンドロイチン硫酸などの細胞外基質を構成するプロテオグリカン含有しないHGF製剤の方が、投与局所の組織において保持され易く、血液を介する全身の他の



臓器への移行、分布を抑えることができることを意味している。

#### 発明の開示

本発明は、以上のような知見に基づいてなされたものである。すなわち本発明は、

- 5 (1) HGFを有効成分とし、投与部位局所の組織及びその近傍組織に有効量の該因子を移行・分布・作用させ、且つ、投与部位以外の血液中及び全身の組織への移行・分布・作用を低減できる製剤、
- (2) 虚血性疾患又は動脈疾患を治療又は予防するための、前記(1)記載の製剤、
- (3) 投与部位が筋肉である、前記(1)又は(2)記載の筋肉内投与用製剤、
- 10 (4) 投与部位が皮下又は表皮である、前記(1)又は(2)記載の皮下投与用製剤、外用剤又はハップ剤、
- (5) 投与部位が骨格筋又は心筋である、前記(3)記載の筋肉内投与用製剤、
- (6) 投与部位である筋肉組織への移行・分布・作用が、血液、肝臓及び腎臓への移行・分布・作用を凌駕することを特徴とする、前記(1)、(2)、(3)又は(
- 15 5)記載の製剤、
- (7) HGFを有効成分として含有する製剤の同量を静脈内へボラス投与した時と比較し、血液、肝臓及び腎臓における最大濃度が100分の1以下であり、投与部位である筋肉組織内濃度が50倍以上であることを特徴とする、前記(1)、(2)、(3)、(5)又は(6)記載の筋肉内投与用製剤、
- 20 (8) HGFを有効成分として含有する製剤の同量を静脈内へボラス投与した時と比較し、血液、肝臓及び腎臓におけるAUCが5分の1以下であり、投与部位である筋肉組織内AUCが50倍以上であることを特徴とする、前記(1)、(2)、(3)、(5)又は(6)記載の筋肉内投与用製剤、
- (9) 心臓または四肢の虚血性疾患または動脈疾患を治療又は予防するための、前
- 25 記(1)、(2)、(3)、(5)、(6)、(7)又は(8)記載の筋肉内投与用製剤、
- (10) 心臓または四肢の虚血性疾患または動脈疾患を治療又は予防するための投

与部位が患部及びその周辺の筋肉局所である、前記（９）記載の筋肉内投与用製剤、

（１１） １回の投与量が $0.01 \sim 500 \mu\text{g}/\text{kg}$ であることを特徴とする、前記（１）、（２）、（３）、（５）、（６）、（７）、（８）、（９）又は（１０）記載の筋肉内投与用製剤、

5 （１２） １回の投与量が $0.1 \sim 10 \mu\text{g}/\text{kg}$ であることを特徴とする、前記（１１）記載の筋肉内投与用製剤、

（１３） 動脈疾患が閉塞性動脈硬化症である、前記（１）～（１２）いずれか記載の製剤、

10 （１４） 虚血性疾患が虚血性心疾患である、前記（１）～（１２）いずれか記載の製剤、並びに

（１５） HGFを有効成分として含有し、且つ、HGFを結合・吸着する物質を含有しないことを特徴とする、前記（１）～（１４）いずれか記載の製剤、に関する。

## 15 図面の簡単な説明

図１は、ラット大腿後部筋肉内にHGFを投与した後の筋肉中濃度推移を示す図である。

図２は、ラット大腿部筋肉内にHGFを投与した後の血清中の濃度推移を示す図である。

20 図３は、ラット大腿部筋肉内にHGFを投与した後の肝臓中の濃度推移を示す図である。

図４は、ラット大腿部筋肉内にHGFを投与した後の腎臓中の濃度推移を示す図である。

25 図５は、ラット下肢虚血モデルの皮膚表面温度に対するHGFの改善効果を示すグラフである。

図６は、HGF含有コラーゲンミニペレットからのHGFの放出を示す図である。

図７は、ラット大腿部筋肉内にHGFを投与した後の筋肉、肝臓、腎臓におけるc

-Met のリン酸化を示す図である。

図8は、ラット下肢虚血ASOモデルに対してHGFを筋肉内投与し、I/N比(%) (虚血肢血圧/正常肢血圧×100)を調べた結果を示す図である。

図9は、ウサギ下肢虚血ASOモデルに対してHGFを筋肉内投与し、下肢血圧のI/N比の推移を調べた結果を示す図である。

図10は、ウサギ下肢虚血ASOモデルに対してHGFを筋肉内投与し、下肢血圧のI/N比の増加率を調べた結果を示す図である。

図11は、ウサギ下肢虚血ASOモデルに対してHGFを筋肉内投与し、血管造影スコアの増加率を調べた結果を示す図である。

10 図12は、ラット下肢虚血ASOモデルに対してHGFを筋肉内投与(1 $\mu$ g/kg×2回投与)し、I/N比を調べた結果を示す図である。

図13は、ラット下肢虚血ASOモデルに対してHGFを筋肉内投与(3 $\mu$ g/kg×単回投与)し、I/N比を調べた結果を示す図である。

## 15 発明を実施するための最良の形態

本発明で使用されるHGFは公知物質であり、医薬として使用できる程度に精製されたものであれば、種々の方法で調製されたものを用いることができ、また既に市販されている製品(例えば、東洋紡株式会社、Code No. HGF-101等)を使用してもよい。HGFの製造法としては、例えば、HGFを産生する初代培養細胞や株化細胞を培養し、培養上清等から分離、精製して該HGFを得ることができる。

20 あるいは遺伝子工学的手法によりHGFをコードする遺伝子を適切なベクターに組み込み、これを適当な宿主に挿入して形質転換し、この形質転換体の培養上清から目的とする組換えHGFを得ることができる(例えばNature, 342, 440(1989)、日本特開平5-111383号公報、Biochem. Biophys. Res. Commun. 163, 967(1989)など参照)。上記の宿主細胞は

25 特に限定されず、従来から遺伝子工学的手法で用いられている各種の宿主細胞、例えば大腸菌、酵母又は動物細胞などを用いることができる。このようにして得られたH

G Fは、天然型H G Fと実質的に同じ作用を有する限り、そのアミノ酸配列中の1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失及び／又は付加されていてもよく、また同様に糖鎖が置換、欠失及び／又は付加されていてもよい。

本発明のH G F含有製剤は、投与部位局所の組織及びその近傍組織に有効量の該因子を移行・分布・作用させ、且つ、投与部位以外の血液中及び全身の組織への移行・分布・作用を低減できることを特徴とする。

具体的な適用疾患としては、例えば虚血性疾患あるいは動脈疾患といった、現在までにH G Fの薬効が確認されている全ての循環器系の疾患が挙げられる。すなわち心疾患としては、虚血性心疾患、心筋梗塞、急性心筋梗塞、心筋症、狭心症、不安定狭心症、冠動脈硬化、心不全などが挙げられ、四肢虚血性疾患としては、閉塞性動脈硬化症、バージャー病、血管損傷、動脈塞栓症、動脈血栓症、臓器動脈閉塞、動脈瘤などが挙げられる。

投与方法としては、前記の如く投与部位局所の組織及びその近傍組織に有効量のH G Fを移行・分布・作用させ、且つ投与部位以外の血液中及び全身の組織への移行・分布・作用を低減できる投与方法であれば如何なる投与方法であっても良い。具体的には、筋肉（骨格筋、心筋）内投与、皮下もしくは表皮への投与が挙げられる。投与形態としては、例えば、注射用水性剤もしくは油性剤、軟膏剤、クリーム剤、ローション剤、エアロゾル剤、ハップ剤などが挙げられる。さらに、徐放性のミニペレット製剤を調製し患部近くに埋め込むこと、あるいはオスモチックポンプなどを用いて患部に連続的に徐々に投与することなども可能である。これらの製剤は、従来公知の技術を用いて調製され、有効成分であるH G Fに対し、必要に応じてp H調整剤、緩衝剤、安定化剤、保存剤、あるいは可溶化剤等を添加しても良い。

その際、本発明のH G F含有製剤は、H G Fに結合・吸着する物質を含有しない製剤であることが好ましい。すなわち、本発明において初めて提示したコンドロイチン硫酸などの細胞外基質の構成成分を配合しないH G F製剤は、配合したものと比較して、投与部位からのH G Fの放出が遅いという特徴を有する。従って投与局所から血中、他の臓器への大量の移行を抑えることができる。さらに、コンドロイチン硫酸と

同じく細胞外基質の構成成分であるヘパリンを配合することにより血中クリアランスの抑制されることが知られているが（Hepatology、20、417（1994））、本発明の製剤は細胞外基質の構成成分を含有しないものであるため、血中に移行したHGFのクリアランスを抑制しない。従って他の臓器への移行性、反応性をさらに抑制し、投与部位である筋肉における有効性を高めることができると考えられる。

ここでHGFを吸着・結合する物質としては、例えば、細胞外基質（マトリックス）の構成成分である糖、糖蛋白、糖脂質、複合糖質などが挙げられる。より具体的には、コンドロイチン硫酸、ヘパラン硫酸、ヘパリン、ヘパリン様物質などが挙げられる。硫酸基などを含む糖、糖蛋白、糖脂質、複合糖質など、HGFに結合・吸着する物質も同様である。また、生体構成成分に限定されず、上記、糖、糖蛋白、糖脂質、複合糖質の一部分を含むことにより、HGFに吸着・結合する物質も同様である。さらに、HGFを吸着・結合する物質としては、蛋白製剤に使用される蛋白質、糖蛋白質などの蛋白キャリアーまたはそれらに含有されるHGFに結合・吸着する物質も含まれる。HGFを吸着・結合する物質として、蛋白キャリアーに微量に含有されるHGFに結合・吸着する物質もこの範疇に含まれる。以上のようなHGFに結合・吸着する物質を含有しないものが、本発明のHGF含有製剤として好ましい。

また、蛋白製剤において、pHやイオン強度、イオン濃度などの条件、あるいは化学修飾などにより、タンパク質の重合の割合などの物性が異なることが知られている。この様なタンパク質の物性の違いも、筋肉などの投与した組織における本発明の投与用製剤の保持、血中への移行性に影響すると考えられる。

後述の実施例に示したように、本発明の投与用製剤は、投与量の少ないことをも特徴とする。投与量としては、患者の症状、年齢、性別等によって異なるが、例えば成人患者の患部またはその周辺に筋肉内投与する場合、以下の投与量が挙げられる。

すなわち、1）本実施例において $1\mu\text{g}/\text{kg}$ の投与量で有効性が確認されている点、2）本実施例にて有効性が確認されたラットの投与量（体重当たり）を体表面積当たりの投与量に換算し、ヒト有効投与量を推定すると $0.2\mu\text{g}/\text{kg}$ 程度と考え

られる点、および3) 当業者の技術常識、等を勘案すれば、本発明の製剤の投与量としては、少なくとも $500 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{回}$ 以下、より具体的には $0.01 \sim 500 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{回}$ 、好ましくは $0.1 \sim 10 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{回}$ 程度が挙げられる。また投与期間・投与頻度としては、長くとも3ヶ月以内の投与期間で週1～2回の投与頻度が  
5 挙げられ、好ましくは1週間以内の投与期間で週7回以下の投与頻度が挙げられる。さらに好ましくは、1週間以内の投与期間で1回または2回の投与頻度が挙げられる。

本発明の投与用製剤を適用する患者における投与部位の特定及び投与方法としては、以下のものが挙げられる。例えば、閉塞性動脈硬化症の虚血肢の診断においては、安静時疼痛、間歇性跛行、潰瘍の有無、トレッドミルを用いた歩行可能な距離の測定、  
10 ドップラー血流計等を用いたAnkle Pressure Index (下肢血圧と上腕血圧の比) の測定を行い、虚血肢、虚血領域を推定する。造影剤を用いた血管造影 (Angiography)、Digital Subtraction Angiography, Magnetic Resonance Angiographyなどにより、血管の狭窄、閉塞部位を詳しく特定する。肢の状態の判定に関しては、例えば、Society  
for Vascular Surgery/ North American Chapter and International Society for C  
15 ardiovascular Surgery により推奨された標準書などに従う。血管造影などにより特定された虚血部位の筋肉及びその周辺の筋肉に対し、本発明の投与製剤を、その領域の大きさに応じて1ヶ所から20ヶ所、好ましくは3ヶ所から6ヶ所に分けて投与する。

さらに本発明の筋肉内投与用製剤は、前記治療目的の他、予防のためにも使用する  
20 ことができる。

## 実施例

以下、実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例によりなんら限定されるものではない。

### 25 実施例 1

#### 投与経路によるHGFの体内動態の比較

##### 1. 筋肉内投与によるHGFの体内動態の検討

## (1)方法

フィッシャー系ラット用いて、HGFを0.3、1、3mg/kgで筋肉内投与した場合と、6、60、600 $\mu$ g/kg/hrで3時間静脈内持続投与した場合の血清、肝臓、腎臓、筋肉（投与部および対側）中HGF濃度を測定した。筋肉内投与は、  
5 エーテル麻酔下で、ラットの左大腿後部筋肉の中央部に行った。投与容量は1ml/kgとし、0.3M NaCl, 0.03% Tween 80, 5mg/ml L-alanineを含む10mMクエン酸緩衝液（pH5.5）をvehicleとして用いた。HGF投与から5分、30分、2時間、8時間、24時間経過後、ラットから血清、肝左側葉、腎臓、筋肉（投与部および対側）を得た。静脈内持続投与はラット  
10 の尾静脈から行い、投与速度は0.07ml/hrとした。投与開始から3時間以上経過後に、同様に血清、肝左側葉、腎臓、筋肉を得た。血清中および各臓器中のヒトHGF濃度については、ヒトHGF測定用ELISAキットであるイムニスHGF EIA（特殊免疫研究所製）を用いて測定した。臓器中のHGFは、2M NaCl、1mM PMSF、1mM EDTA、0.1% Tween 80を含有する2  
15 0mM Tris-HCl（pH 7.5）を抽出液として用い（筋肉：12ml/g tissue、肝臓・腎臓：8ml/g tissue）、1分間ホモジナイズした後、4℃、15,000rpmで60分間遠心分離し、抽出液中のHGF量を上述のELISAキットにて測定した。その際、スタンダード溶液についても、HGFを投与していないラットの臓器に既知濃度のHGFを添加し、同様に抽出した溶液を用  
20 いた。また、サンプルの希釈液についても、HGFを投与していないラットの臓器の抽出液を同様に調製して用いた。濃度推移の解析にはモーメント解析法を用いた。

## (2)結果

HGFを大腿部筋肉内に投与した後の筋肉におけるHGF濃度の推移について、図1に示す。HGFを尾静脈内へ持続投与した後の結果についても、併せて図1に示す。  
25 HGFを尾静脈から6、60 $\mu$ g/kg/hrで3時間持続投与したときの筋肉中濃度については測定限界（1.5ng/g tissue）以下であった。3mg/kgで筋肉内投与した場合の筋肉中における薬物動態パラメータを表1に示した。投与

部筋肉内におけるHGFの $t_{1/2}$ は10.6時間であり、投与24時間後においてもピーク時の約18%の濃度が維持されていた。HGFを尾静脈よりボラス投与した場合も、例えば0.3mg/kgのHGFの投与により筋肉内に検出されるHGF濃度は、10ng/g tissueのオーダーである。

5

表1

| 投与経路、投与量                          | 筋肉内投与、3mg/kg       |      |
|-----------------------------------|--------------------|------|
| 筋肉部位                              | 投与部                | 対側   |
| AUC(hr·ng/g tissue)<br>(infinite) | $11.6 \times 10^5$ | 820  |
| $t_{1/2}$ (hr)                    | 10.6               | 11.2 |
| Cmax(ng/g tissue)                 | $84.1 \times 10^3$ | 82.4 |
| Tmax                              | 5min               | 5min |

なお、表1において、対側とは、反対側の投与部位に対応する部位である。即ち、本例では、左大腿後部筋肉に投与しているので、その反対側である右大腿後部筋肉である。

- 10 以上の図1および表1に示されるように、HGFを筋肉内投与した場合、投与した筋肉内で非常に高い濃度を示した。これらは、HGFが薬効を示すために十分すぎる濃度であると考えられた。一方、対側の筋肉内においては、投与部の約1/1000の濃度に留まった。図2に示されるように、HGFを筋肉内に投与した場合、血清中のHGF濃度は比較的lowく推移し、投与部筋肉内から循環血中への移行率は6.7%と低かった。また、図3、4に示されるように、HGFを筋肉内投与した場合、肝臓、腎臓中のHGF濃度は静脈内投与した場合と比較して、極端に低かった。HGFを静脈内へ持続投与した後の血清中、肝臓、腎臓のHGF濃度の結果についても、併せて図2、3、4に示す。
- 15

HGFを静脈内に持続投与した場合、血清、肝臓、腎臓中のHGF濃度が高く持続



されるのに対し、筋肉内におけるHGF濃度は極端に低かった。最高投与量である600  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{hr}$  群を例にとると、血清中では536  $\text{ng}/\text{ml}$  のHGFが存在していたのに対し、筋肉中では10  $\text{ng}/\text{g}$  tissue未滿しか存在しなかった。このことから、虚血筋肉患部及びその周辺の筋肉又はそこに存在する血管に選択的にHGFを作用させる事を目的とした場合、静脈内投与では効率が悪く、局所筋肉内に直接投与する方が有効であると考えられた。また、HGFを筋肉内に投与する事により、他の部位には作用させずに、筋肉組織に選択的にHGFを作用させる事ができ得ると考えられた。

## 2. 投与経路によるHGF血中濃度推移の比較

### 10 (1)方法

フィッシャー系ラット用いて、HGFを3  $\text{mg}/\text{kg}$  で筋肉内投与した場合と、0.3  $\text{mg}/\text{kg}$  で静脈内bolus投与した場合と、3  $\text{mg}/\text{kg}$  で皮下投与した場合の血清中HGF濃度を測定した。筋肉内投与は、エーテル麻酔下で、ラットの左大腿後部筋肉の中央部に行った。投与容量は1  $\text{ml}/\text{kg}$  とし、0.3M NaCl, 0.03% Tween 80, 5  $\text{mg}/\text{ml}$  L-alanineを含む10mMクエン酸緩衝液(pH 5.5)をvehicleとして用いた。筋肉内投与では、HGFの投与から5分、30分、2時間、8時間、24時間経過後にラットから血清を採取した。静脈内投与はラットの尾静脈から行い、投与から2分、5分、15分、30分、1時間、2時間、3時間、12時間、24時間経過後に血清を採取した。また、皮下投与では、投与後5分、15分、30分、1時間、2時間、5時間、12時間、24時間に血清を得た。ラット血清中のヒトHGF濃度については、ヒトHGF測定用ELISAキットであるイムニスHGF EIA (特殊免疫研究所製)を用いて測定した。濃度推移の解析にはモーメント解析法を用いた。

### (2)結果

25 測定結果を解析して得られた薬物動態パラメータを表2に示す。ただし、静脈内bolus投与については、投与量に対する線形性を仮定し、3  $\text{mg}/\text{kg}$  のHGF投与時のパラメータを算出した。血清中におけるAUCは、静脈内bolus投与に比

べて、筋肉内投与、皮下投与で低く、それぞれ静脈内bolus投与のAUCの6.7%、2.6%であった。また、最高血清中濃度(C<sub>max</sub>)についても、静脈内bolus投与に比べて、筋肉内投与、皮下投与で低く、それぞれ静脈内bolus投与のC<sub>0</sub>の0.012%、0.0087%であった。

5

表2

| 投与経路   | 筋肉内    | 静脈内 bolus                  | 皮下      |
|--|--------|----------------------------|---------|
| 投与量  | 3mg/kg | 3mg/kg                     | 3mg/kg  |
| AUC (min·ng/ml<br>(infinite))                      | 6310   | 94390                      | 2419    |
| t <sub>1/2</sub> (min)                             | 801    | 8.8                        | 525     |
| C <sub>max</sub> or C <sub>0</sub><br>(ng/ml)      | 8.96   | 73380<br>(C <sub>0</sub> ) | 6.42    |
| T <sub>max</sub>                                   | 5min   | —                          | 5min    |
| AUC ratio<br>(% i.v.)                              | 6.7%   | —                          | 2.6%    |
| C <sub>max</sub> ratio<br>(% i.v. C <sub>0</sub> ) | 0.012% | —                          | 0.0087% |

### 3. 投与経路によるHGF筋肉内濃度推移の比較

#### (1)方法

- 10 SD系ラット用いて、HGFを0.01mg/kgで筋肉内投与した場合と、30mg/kgで静脈内bolus投与した場合の筋肉中HGF濃度を測定した。筋肉内投与は、エーテル麻酔下で、ラットの左大腿後部筋肉の中央部に行った。投与容量は0.5ml/kgとし、0.3M NaCl, 0.03% Tween 80, 5mg/ml L-alanineを含む10mMクエン酸緩衝液(pH5.5)をvehicleとして用いた。HGF投与から30分、6時間、24時間経過後、ラットから筋肉(投与部)を得た。静脈内bolus投与はラットの尾静脈から1ml/kgにて行い、投与から5分、30分、1時間、24時間経過後、同様に筋肉を採取した。
- 15

筋肉中のヒトHGF濃度については、ヒトHGF測定用ELISAキットであるイム  
ニスHGF EIA（特殊免疫研究所製）を用いて測定した。臓器中のHGFは、2  
M NaCl、1mM PMSF、1mM EDTA、0.1% Tween80を含  
有する20mM Tris-HCl（pH 7.5）を抽出液として用い（12ml/  
5 g tissue）、1分間ホモジナイズした後、4℃、15,000rpmで60  
分間遠心分離し、抽出液中のHGF量を上述のELISAキットにて測定した。その  
際、スタンダード溶液についても、HGFを投与していないラットの筋肉に既知濃度  
のHGFを添加し、同様に抽出した溶液を用いた。また、サンプルの希釈液につい  
ても、HGFを投与していないラットの筋肉の抽出液を同様に調製して用いた。濃度推  
10 移の解析にはモーメント解析法を用いた。

## (2)結果

筋肉内ヒトHGF濃度を測定した結果から得られた薬物動態パラメータについて、  
表3に示す。但し、比較のため、静脈内bolus投与については、投与量に対する  
線形性を仮定し、0.01mg/kgのHGF投与時のパラメータを算出した。同量  
15 のHGF投与を仮定した場合、筋肉中におけるAUCは静脈内bolus投与に比べ  
て、筋肉内投与（投与部）で著しく高く、静脈内bolus投与の約650倍であっ  
た。また、最高筋肉中濃度（Cmax）についても、静脈内bolus投与に比べて、  
筋肉内投与（投与部）で著しく高く、静脈内bolus投与の約960倍であった。

表3

|                         | 筋肉内 (im) | 静脈内 bolus (iv) | im / iv |
|-------------------------|----------|----------------|---------|
| AUC<br>(ng·hr/g muscle) | 4160     | 6.37           | 650     |
| Cmax<br>(ng/g muscle)   | 459      | 0.476          | 960     |

20

## 実施例2

### ラット下肢虚血ASOモデルに対する筋肉内投与の薬効検討

#### (1)方法

SD系ラット（9週齢、雄）を用いた。約50 mg/kgのペントバルビタール（ダイナボット社製、ネンブタール）を腹腔内投与し、ラットを麻酔した。分枝を結紮した後、左大腿動脈を摘出し、ラット下肢虚血モデルを作成した。ラットをエーテルにより麻酔し、左大腿部内側の筋肉内にHGFまたはvehicleを投与した。大腿動脈摘出直後から投与を開始し、投与量1 mg/kg/day、投与容量1 ml/kg/day、1日1回、5日間投与した。vehicleとして0.3 M NaCl, 0.03% Tween 80, 5 mg/ml alanine, 10 mM Na-citrate buffer (pH 5.5)を用いた。大腿動脈摘出から14日後に、ペントバルビタールによりラットを麻酔し、下肢周辺の毛を除毛クリームにて除毛した後、サーモグラフィー（日本アビオニクス社製）を用いて、大腿下部内側（図5の部位1）・下腿部内側（同部位2）・膝下外側（同部位3）・下腿前部外側（同部位4）・大腿下部外側（同部位5）・下腿部外側（同部位6）の6ヶ所の皮膚表面温度を、両下肢同時に測定した。それぞれの測定部位について、虚血肢温度から正常肢温度を引き、皮膚表面温度の差を算出した。

## 15 (2)結果

虚血肢と正常肢の皮膚表面温度の差を図5に示す。即ち、大腿動脈を摘出し、vehicleを投与した群（図中、白）では、虚血肢の各部位において、正常肢と比べて0.8～1.7℃の温度低下が見られた。それに対して、HGFを投与した群（図中、黒）においては、0.2～1.0℃の温度低下に抑えられていた。各部位毎に、温度低下を2群間で比較したところ、6ヶ所全ての部位において、HGF投与群の方が温度低下が小さい傾向が見られた。また、下腿部内側および大腿下部外側の2ヶ所においては、HGFの投与により有意に温度低下が抑制された。

以上の図5から示されるように、ラット下肢虚血モデルを作製し、虚血肢の大腿部筋肉内にHGFを投与したところ、虚血肢における皮膚表面温度の低下が抑制された。これは、HGFが持つ血管新生作用により、虚血肢における血行動態が改善され、温度の低下が抑制されたと考えられる。

## 実施例 3

HGF含有ミニペレットからのin vitro HGF放出におけるコンドロイチン硫酸の影響

## (1)アラニン10%含有のHGF含有ミニペレットの調製法

5 HGF含有量：131. 2  $\mu$ g/mgミニペレット

HGF 65. 3 mgを含有する水溶液6. 9 mlと1%アラニン水溶液4. 4 mlと蒸留水16 mlおよび2%アテロコラーゲン16. 7 gを混合し、凍結乾燥した後、少量の蒸留水を加えて膨潤させ、練合し、均質な混合液にした。これを10 mlのディスポーザブルシリンジに入れ、10, 000 Gで60分間遠心脱泡した。これをシリンジから押し出した後、乾燥し、切断することにより一本あたり 500  $\mu$ gのHGFを含有する棒状のミニペレット（直径1. 1 mm、長さ4 mm）を得た。

## (2)コンドロイチン硫酸10%含有のHGF含有ミニペレットの調製法

HGF含有量：132. 8  $\mu$ g/mgミニペレット

15 HGF 65. 3 mgを含有する水溶液6. 9 mlと1. 5%コンドロイチン硫酸ナトリウム水溶液2. 9 mlと蒸留水17 mlおよび2%アテロコラーゲン16. 7 gを混合し、凍結乾燥した後、少量の蒸留水を加えて膨潤させ、練合し、均質な混合液にした。これを10 mlのディスポーザブルシリンジに入れ、10, 000 Gで60分間遠心脱泡した。これをシリンジから押し出した後、乾燥し、切断することにより一本あたり500  $\mu$ gのHGFを含有する棒状のミニペレット（直径0. 9 mm、長さ4 mm）を得た。

## (3) in vitro 放出試験

0. 3% Tween 20を含むPBS (pH 7. 4)を放出液として用いた。37℃において、2 mlの放出液中に上述の方法で調製したミニペレットを各々入れ、HGFの放出速度を測定した (n = 2)。放出液中のHGF濃度については、ヘパリンアフィニティークロマトグラフ法にて測定した。

実験結果を図6に示す。即ち、コンドロイチン硫酸含有のミニペレットからは、1日後にはほぼ100%のHGFが放出されたのに対し、コンドロイチン硫酸を含有しな

いアラニン含有ミニペレットからは緩やかにHGFが放出された。放出開始から7日後においても放出されたHGF量はミニペレット含有量の30%未満に留まった。これは、HGFと親和性を持つコンドロイチン硫酸などのプロテオグリカンとHGFを共存させる事により、HGFの放出を促進させ得る事を示す。また逆に、コンドロイチン硫酸などのプロテオグリカンを共存させない事により、放出を緩やかにし、投与部位に局所的にHGFを作用させ得る可能性を示す。

#### 実施例4

##### ラット筋肉内HGF投与後の各臓器におけるc-Metのリン酸化

###### 10 (1)方法

SD系ラット(12週齢、雄)を用いて、筋肉内投与後の筋肉、肝臓、腎臓におけるc-Metのリン酸化について検討した。エーテル麻酔下でラットの左大腿後部筋肉内に3、0.3、0.03mg/kgのHGFを投与した。投与から5分、30分後にラットを脱血し、筋肉、肝臓、腎臓を摘出した。摘出した臓器にRIPABuffer(50mM Tris-HCl(pH7.4), 50mM NaCl, 1% TritonX-100, 5mM EDTA, 10mM  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ , 50mM NaF, 1mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 0.4mM AEBSF, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$  Leupeptin, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$  Aprotinin, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$  PepstatinA)を5(筋肉)または8(肝臓、腎臓)ml/g tissue添加し、ポリトロンを用いてホモジネートした。そして、16000rpm、4℃、30分間遠心分離することにより沈殿を除いた。10mg(筋肉)または5mg(肝臓、腎臓)の蛋白を含む抽出液をRIPABufferで1mlとし、50 $\mu\text{l}$ (約50%)のProtein G Sepharose(Pharmacia社)を加え、4℃で、2時間攪拌した。遠心により、Protein G Sepharoseを除き、その上清に1 $\mu\text{g}$ の抗c-Met抗体(Santa Cruz社)を加え、4℃で一晩攪拌した。さらに、20 $\mu\text{l}$ のProtein G Sepharoseを加え、4℃で2時間攪拌した。遠心により上清を除き、Protein G Sepharoseを1

mlのRIPAbufferで3回洗浄した後、2×loading bufferを加え、100℃、5分間加熱し、7.5% SDS-PAGEに供した。泳動した蛋白はニトロセルロースフィルター上に電氣的に転写、結合させた。フィルターは、3% BSAを含むTBS-T (10mM Tris-HCl (pH 7.6), 150mM NaCl, 0.05% Tween 20) 中で振とうすることにより、ブロッキングした。TBS-Tで軽く洗浄後、1μg/mlの抗リン酸化チロシン抗体 (Upstate Biotechnology社) を含むTBS-T中で、室温、1時間振とうした。さらにTBS-Tで洗浄後、2000倍希釈したペルオキシダーゼ標識抗マウスIg抗体 (Amersham社) を含むTBS-T中で、室温、1時間振とうした。TBS-Tで洗浄後、ECLウエスタンブロット検出試薬 (Amersham社) を用いて、リン酸化されたc-Metの検出を行った。

フィルターは、62.5mM Tris-HCl (pH 6.7), 100mM 2-mercaptoethanol, 2% SDS溶液中で、60℃、30分間振とうすることにより、デプローブし、TBS-Tで洗浄後、3% BSAを含むTBS-T中で振とうすることにより、ブロッキングした。TBS-Tで軽く洗浄後、0.5μg/mlの抗c-Met抗体を含むTBS-T中で、室温、1時間振とうした。さらにTBS-Tで洗浄後、2000倍希釈したペルオキシダーゼ標識抗ウサギIg抗体 (Amersham社) を含むTBS-T中で、室温、1時間振とうした。TBS-Tで洗浄後、ECLウエスタンブロット検出試薬を用いて、c-Metの検出を行った。

## (2)結果

リン酸化c-Metに対するIP-Westernの結果を図7に示す。筋肉組織では、0.03~3mg/kgの各投与量において、c-Metの著しいリン酸化が見られた。一方、肝臓および腎臓においては、HGF筋肉内投与によるc-Metのリン酸化は見られなかった。この事は、3mg/kg以下のHGFを筋肉内に投与する事により、肝臓・腎臓に作用させる事無く、筋肉組織・筋肉組織中の血管に選択的にHGFを作用させ得る事を示している。

## 実施例 5

ラット下肢虚血 A S O モデルに対する筋肉内投与の薬効検討 (1)

## (1)方法

5 SD系ラット (14週齢、雄) を用いた。約 50 mg/kg のペントバルビタール (ダイナボット社製、ネンブタール) を腹腔内投与し、ラットを麻酔した。分枝を結紮した後、左大腿動脈を摘出し、ラット下肢虚血モデルを作成した (Cardiovascular Research, 35, 547-552 (1997) 参照)。その直後に、左大腿部の筋肉内に HGF または vehicle を投与した。投与量は 10  
10 0  $\mu$ g/kg、投与容量は 1 ml/kg とした。さらに 4 日後、エーテル麻酔下で同様に投与を行った。vehicle として 0.3 M NaCl, 0.03% Tween 80, 5 mg/ml alanine, 10 mM Na-citrate buffer (pH 5.5) を用いた。大腿動脈摘出から 14 日後に、ペントバルビタールによりラットを麻酔し、実験動物用非観血式血圧計を用いて下肢血圧を測定した。正  
15 常肢、虚血肢それぞれの血圧から I/N 比 (%) = 虚血肢血圧 / 正常肢血圧  $\times$  100 を計算し、評価を行った。

## (2)結果

結果を図 8 に示す。HGF 投与群では、vehicle 投与群に比べ有意に I/N 比が改善された。これは、HGF が持つ血管新生作用によるものと考えられた。

20

## 実施例 6

ウサギ下肢虚血 A S O モデルに対する筋肉内投与の薬効検討

## (1)方法

NZW系ウサギ (22週齢、雄) を用いた。5 mg/kg のキシラジン (バイエル  
25 株式会社製、セラクター) および 50 mg/kg のケタミン (三共株式会社製、ケタラル) を上腕部筋肉内に投与し、ウサギを麻酔した。左大腿部を切開し、左大腿動脈を摘出することにより、ウサギ下肢虚血モデルを作成した (J. Clin. In



vest., 93, 662-670 (1994) 参照)。その10日後および15日後に、同様に麻酔を行い、左大腿部の筋肉内にHGFまたはvehicleを投与した。投与量は $100 \mu\text{g}/\text{kg}$ 、投与容量は $1\text{ml}/\text{kg}$ とした。vehicleとして0.3M NaCl, 0.03% Tween 80,  $5\text{mg}/\text{ml}$  alanine, 10mM Na-citrate buffer (pH 5.5) を用いた。大腿動脈摘出から10日後(薬液投与前)、22日後、および42日後に、上記方法によりウサギを麻酔し、ドップラー血流計(Triton社製)と水銀血圧計を用いて両下肢の血圧を測定した。正常肢、虚血肢それぞれの血圧から $I/N$ 比(%) = 虚血肢血圧/正常肢血圧 $\times 100$ を計算し、評価を行った。10日後からの $I/N$ 比の増加率についても算出し、評価した。また、動脈摘出から10日後および最終日(41または42日後)に、造影剤(山之内製薬株式会社製、オプチレイ350)を用いて左下肢選択的に血管造影を行った。得られた血管造影写真に、直径2.5mmの円を並べたシートを重ね、血管と重なっている円の数のカウントし、円の全数(800個)に対する割合を算出し、血管造影スコアとした。各ウサギの血管摘出10日後の血管造影スコアから最終日の血管造影スコアへの増加率(%)を計算し、血管造影スコア増加率として評価した。最終日に、虚血肢関節の硬化度、虚血肢爪先の壊死・脱落、虚血肢下腿部の潰瘍について観察した。

## (2)結果

下肢血圧の $I/N$ 比の推移を図9に示す。動脈摘出22日後から、HGF投与群で高値の傾向を示し、42日後において、HGF投与群では、vehicle投与群に比べ有意に $I/N$ 比が改善された。これは、HGFが持つ血管新生作用により、虚血肢の血行動態が改善したものと考えられた。また、下肢血圧の $I/N$ 比の増加率を図10に示す。動脈摘出10日後から42日後までの $I/N$ 比の増加率は、vehicle群と比較してHGF投与群で有意に高かった。血管造影スコアの増加率を図11に示す。vehicle投与群に比べて、HGF投与群の方が有意に増加率が高く、HGFの作用により側副血行路の発達が促進されたものと考えられた。評価最終日の虚血肢の観察においても、HGF投与群の方が、vehicle投与群と比較して症

状が軽い傾向が認められ（表 4）、HGF 投与による虚血肢の血行動態の改善を反映していると思われた。

表 4

| 群            | 下肢関節の硬化 |    |    | 爪先の壊死・脱落 | 虚血肢の潰瘍 |
|--------------|---------|----|----|----------|--------|
|              | なし      | 軽度 | 重度 |          |        |
| vehicle(n=8) | 4       | 1  | 3  | 1        | 3      |
| HGF(n=8)     | 6       | 2  | 0  | 0        | 0      |

5

### 実施例 7

#### ラット下肢虚血 A S O モデルに対する筋肉内投与の薬効検討（2）

##### （1）方法

SD系ラット（14週齢、雄）を用いた。約50mg/kgのペントバルビタール（  
 10 ダイナボット社製、ネンブタール）を腹腔内投与し、ラットを麻酔した。分枝を結紮  
 した後、左大腿動脈を摘出し、ラット下肢虚血モデルを作製した（Cardiovascular  
 Research, 35, 547-552（1997）参照）。その  
 直後に、左大腿部の筋肉内にHGFまたはvehicleを投与した。投与量は1μ  
 g/kgとし、投与容量はすべての実験で1ml/kgとした。さらに4日後、エーテ  
 15 ル麻酔下で同様に2回目の投与を行った。vehicleとして0.3M NaCl,  
 0.03% Tween80, 5mg/ml alanine, 10mM Na-c  
 itrate buffer（pH5.5）を用いた。大腿動脈摘出から7日後に、  
 ペントバルビタールによりラットを麻酔し、実験動物用非観血式血圧計を用いて下肢  
 20 血圧を測定した。正常肢、虚血肢それぞれの血圧からI/N比＝虚血肢血圧／正常肢  
 血圧を計算し、評価を行った。

また、単回投与における効果を調べるため、大腿動脈摘出当日のみに投与を行い、  
 同様の実験を行った。HGFの投与量は3μg/kgとした。

##### （2）結果

2回投与による結果を図12に示した。大腿動脈摘出7日後において、HGF投与

群では、vehicle投与群に比べ有意にI/N比が改善された。これは、HGFが持つ血管新生作用によるものと考えられた。HGFは $1\mu\text{g}/\text{kg}$  X 2回という低用量で効果があることが示された。

また、単回投与による結果を図13に示した。大腿動脈摘出7日後において、HGF投与群では、vehicle投与群に比べ有意にI/N比が改善された。HGFは単回投与でも効果があることが示された。

#### 製剤例1

生理食塩水100ml中にHGF1mg、マンニトール1g及びポリソルベート80 10 0 10mgを含む溶液を無菌的に調製し、1mlずつバイアルに分注した後、凍結乾燥して密封することにより凍結乾燥製剤を得た。

#### 製剤例2

0.02Mリン酸緩衝液(0.15M NaCl及び0.01%ポリソルベート80 15 含有、pH7.4)100ml中にHGF1mg及びヒト血清アルブミン100mgを含む水溶液を無菌的に調製し、1mlずつバイアルに分注した後、凍結乾燥して密封することにより凍結乾燥製剤を得た。

#### 産業上の利用可能性

20 本発明により、HGFを有効成分として含有し、虚血性疾患あるいは動脈疾患を治療又は予防するための投与用製剤が提供される。本発明の筋肉内投与用製剤は、静脈内投与と比較して半減期が長く、筋肉内に維持されやすいことから、従来の静注等と比較して投与量が低減でき、また患部以外への作用が少ないという効果を有する。

## 請 求 の 範 囲

1. 肝実質細胞増殖因子（HGF）を有効成分とし、投与部位局所の組織及びその近  
5 傍組織に有効量の該因子を移行・分布・作用させ、且つ、投与部位以外の血液中及び  
全身の組織への移行・分布・作用を低減できる製剤。
2. 虚血性疾患又は動脈疾患を治療又は予防するための、請求項 1 記載の製剤。
3. 投与部位が筋肉である、請求項 1 又は 2 記載の筋肉内投与用製剤。
4. 投与部位が皮下又は表皮である、請求項 1 又は 2 記載の皮下投与用製剤、外用剤  
10 又はハップ剤。
5. 投与部位が骨格筋又は心筋である、請求項 3 記載の筋肉内投与用製剤。
6. 投与部位である筋肉組織への移行・分布・作用が、血液、肝臓及び腎臓への移行  
・分布・作用を凌駕することを特徴とする、請求項 1、2、3 又は 5 記載の製剤。
7. 肝実質細胞増殖因子（HGF）を有効成分として含有する製剤の同量を静脈内へ  
15 ボーラス投与した時と比較し、血液、肝臓及び腎臓における最大濃度が 100 分の 1  
以下であり、投与部位である筋肉組織内濃度が 50 倍以上であることを特徴とする、  
請求項 1、2、3、5 又は 6 記載の筋肉内投与用製剤。
8. 肝実質細胞増殖因子（HGF）を有効成分として含有する製剤の同量を静脈内へ  
ボーラス投与した時と比較し、血液、肝臓及び腎臓における AUC が 5 分の 1 以下で  
20 あり、投与部位である筋肉組織内 AUC が 50 倍以上であることを特徴とする、請求  
項 1、2、3、5 又は 6 記載の筋肉内投与用製剤。
9. 心臓または四肢の虚血性疾患または動脈疾患を治療又は予防するための、請求項  
1、2、3、5、6、7 又は 8 記載の筋肉内投与用製剤。
10. 心臓または四肢の虚血性疾患または動脈疾患を治療又は予防するための投与部  
25 位が患部及びその周辺の筋肉局所である、請求項 9 記載の筋肉内投与用製剤。
11. 1 回の投与量が 0.01～500  $\mu\text{g}/\text{kg}$ であることを特徴とする、請求項  
1、2、3、5、6、7、8、9 又は 10 記載の筋肉内投与用製剤。

12. 1回の投与量が0.1～10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ であることを特徴とする、請求項11記載の筋肉内投与用製剤。
13. 動脈疾患が閉塞性動脈硬化症である、請求項1～12いずれか記載の製剤。
14. 虚血性疾患が虚血性心疾患である、請求項1～12いずれか記載の製剤。
- 5 15. 肝実質細胞増殖因子(HGF)を有効成分として含有し、且つ、HGFを結合・吸着する物質を含有しないことを特徴とする、請求項1～14いずれか記載の製剤。

図 1

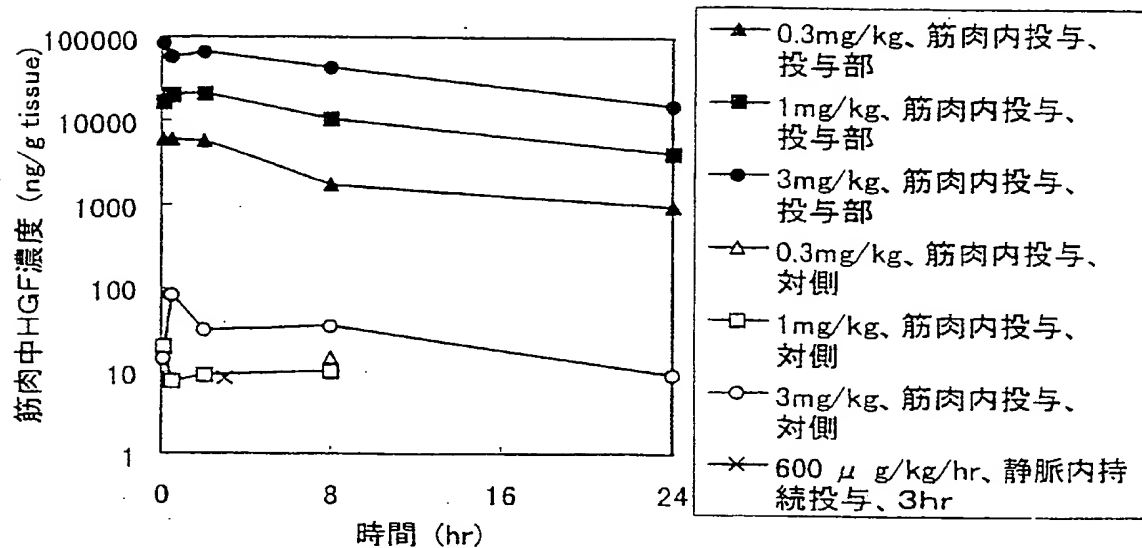


図 2

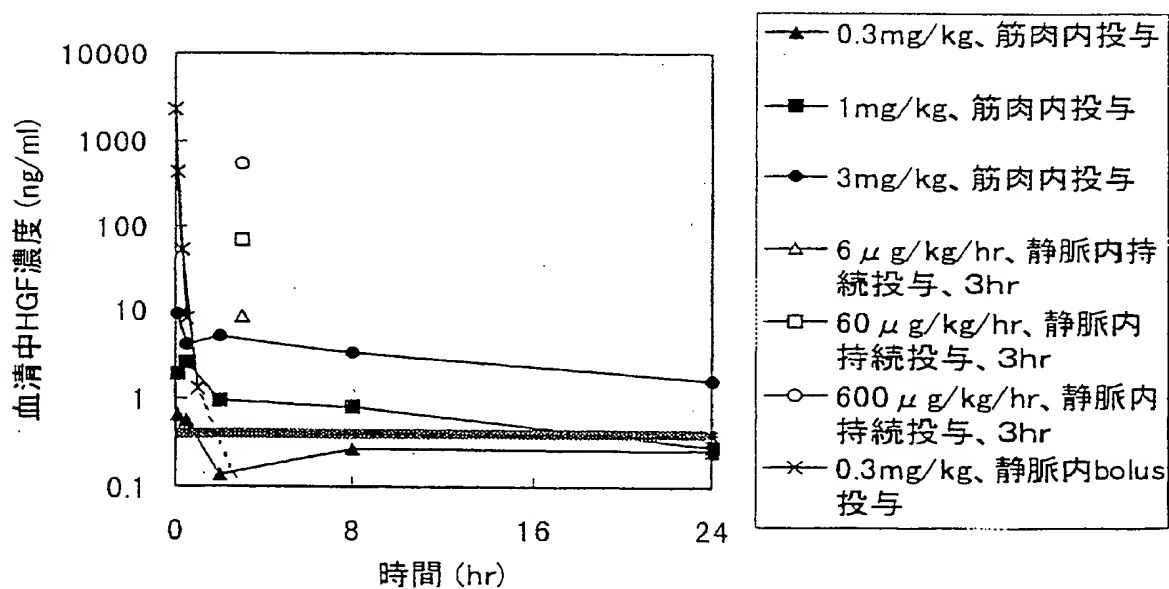


図 3

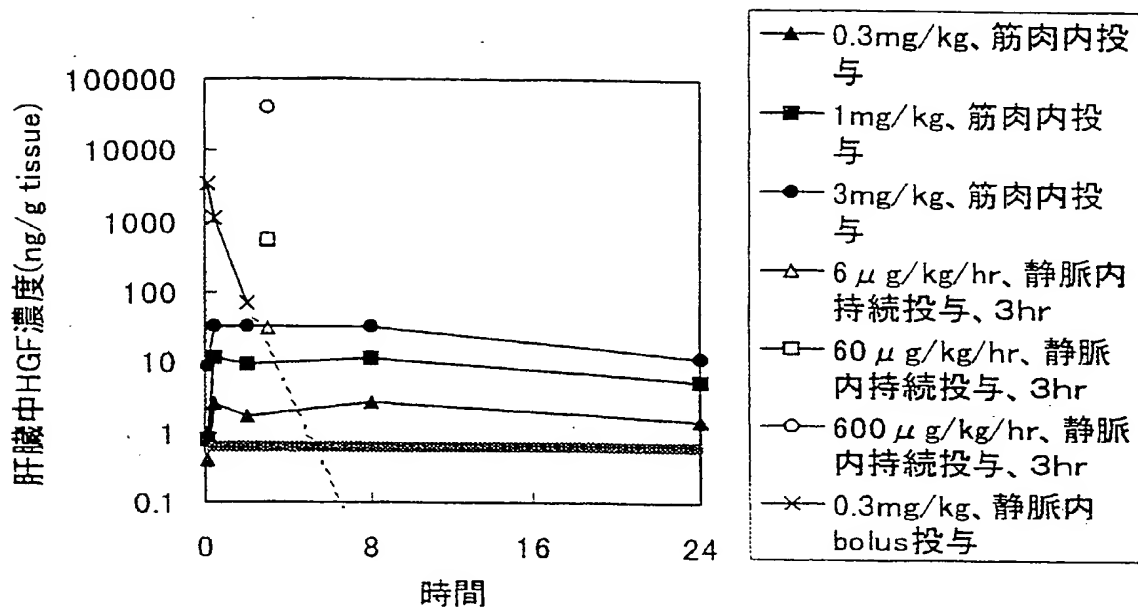


図 4

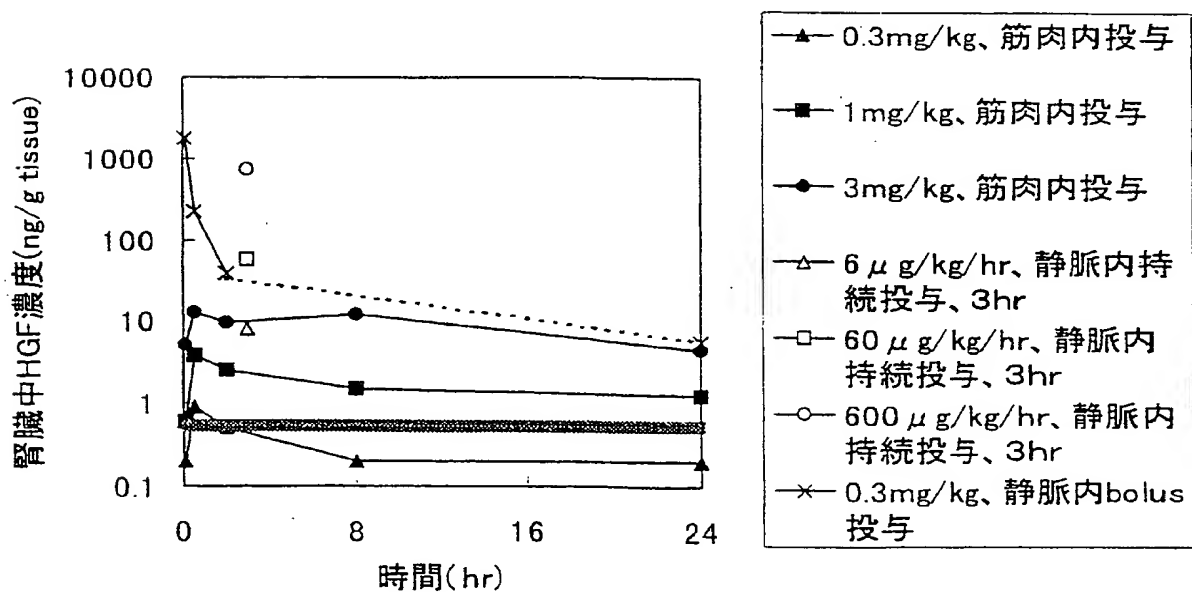


図 5

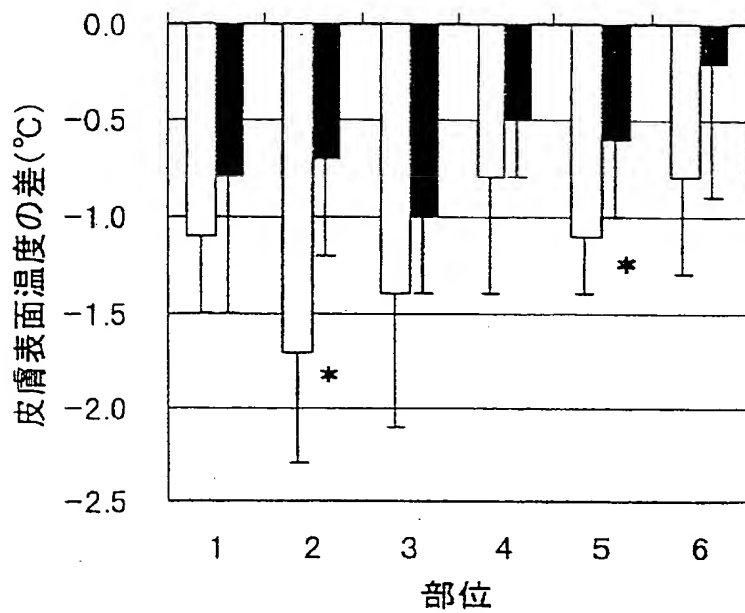
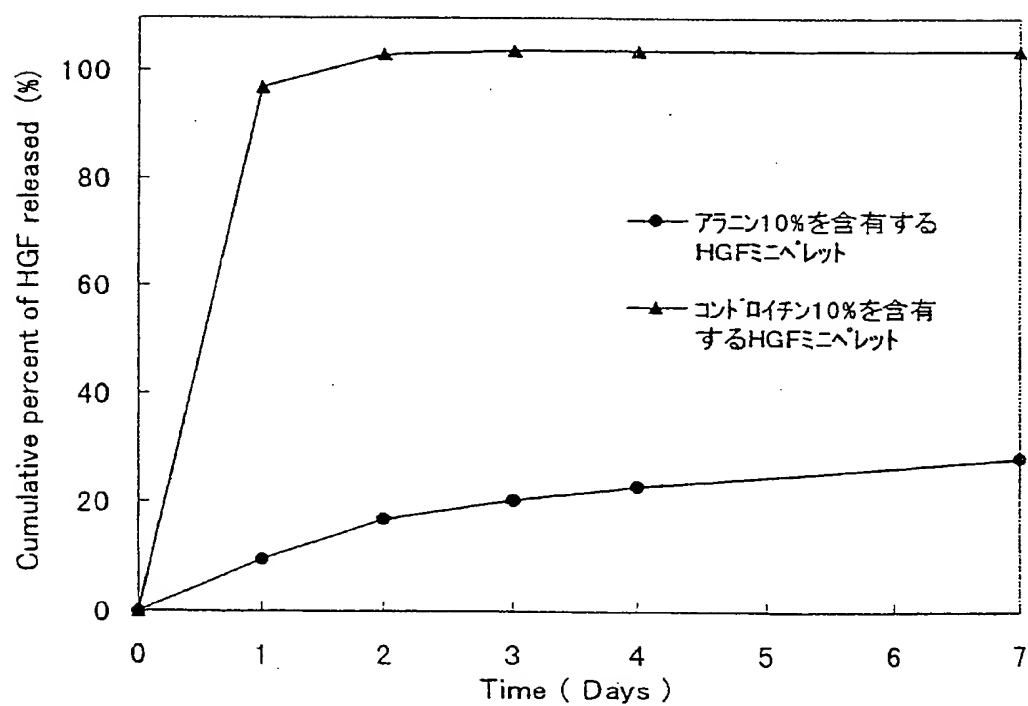
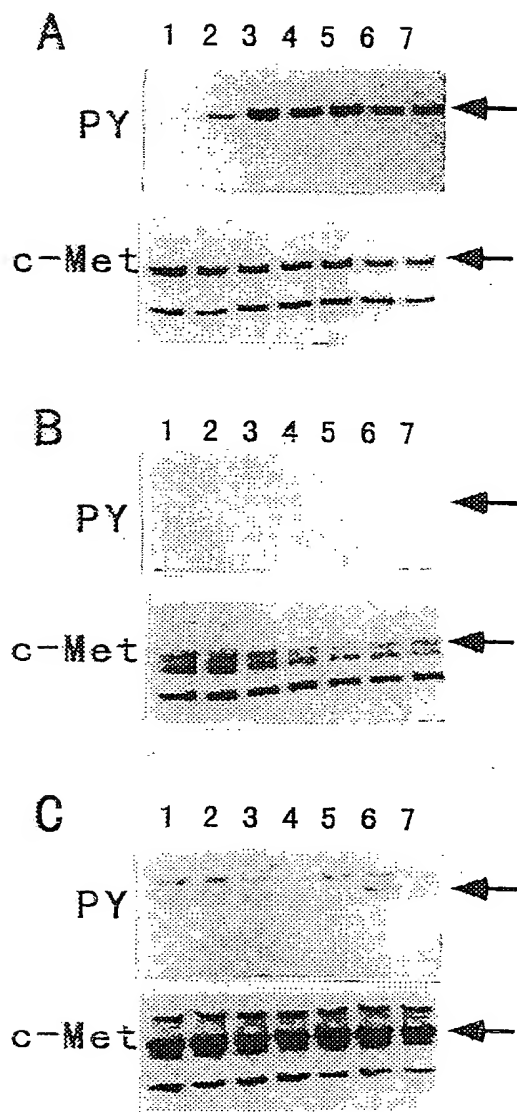


図 6





 7


A : 筋肉、B : 腎臓、C : 肝臓

1 : 無処置、2 : 0.03mg/kg HGF投与5分後、3 : 0.03mg/kg HGF投与30分後  
 4 : 0.3mg/kg HGF投与5分後、5 : 0.3mg/kg HGF投与30分後  
 6 : 3mg/kg HGF投与5分後、7 : 3mg/kg HGF投与30分後

PY: 抗リン酸化Tyr抗体によるblotting  
 c-Met: 抗c-Met抗体によるblotting  
 矢印は、c-Metの位置を示す。

図 8

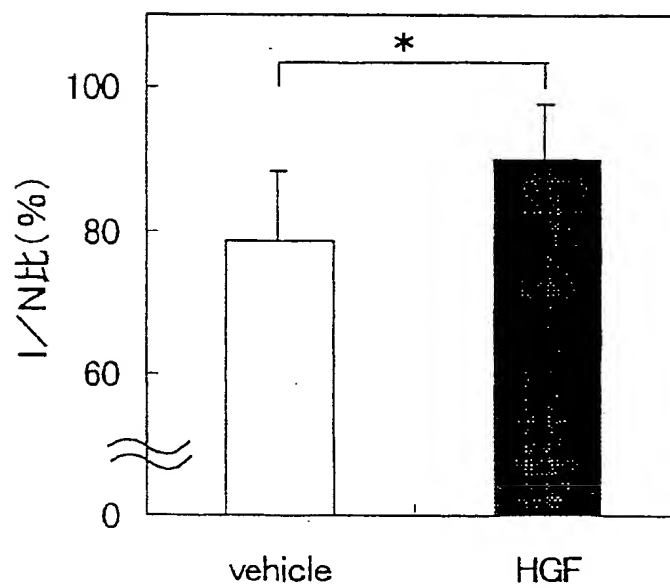


図 9

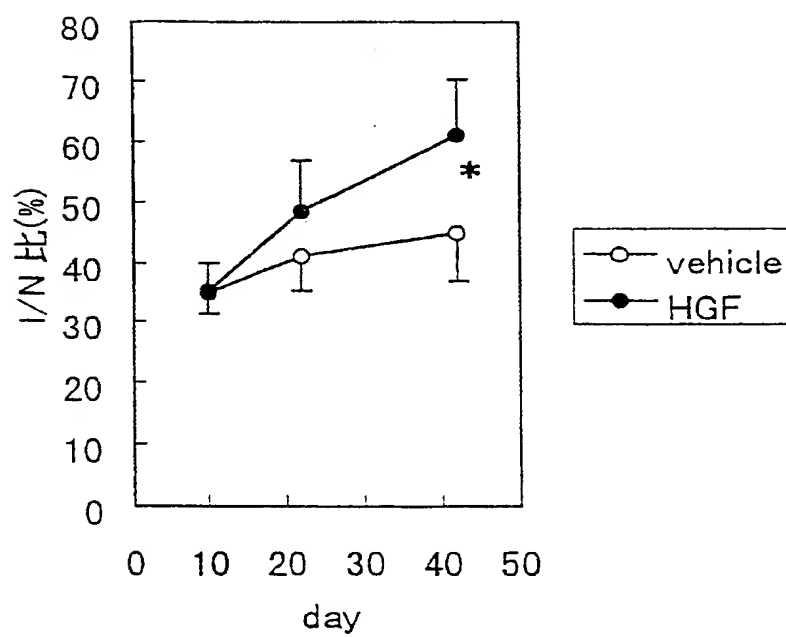


図 1 O

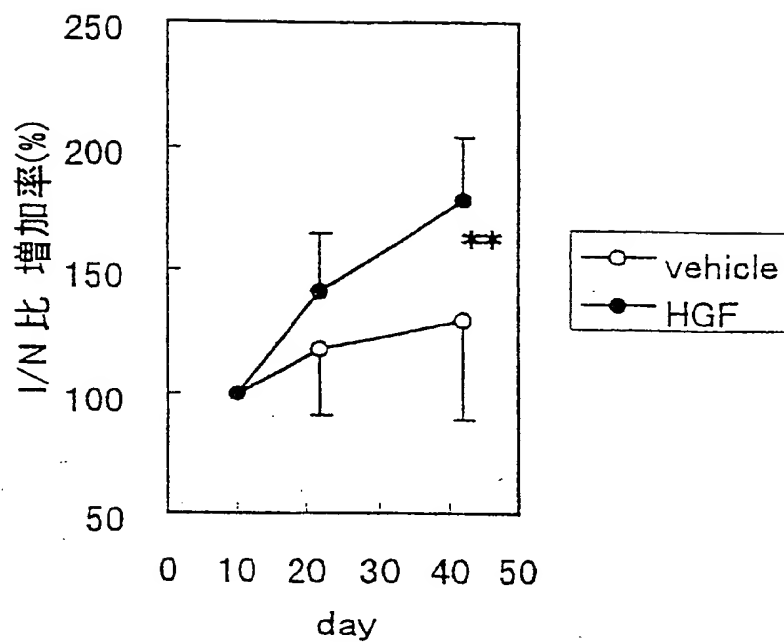


図 1 1

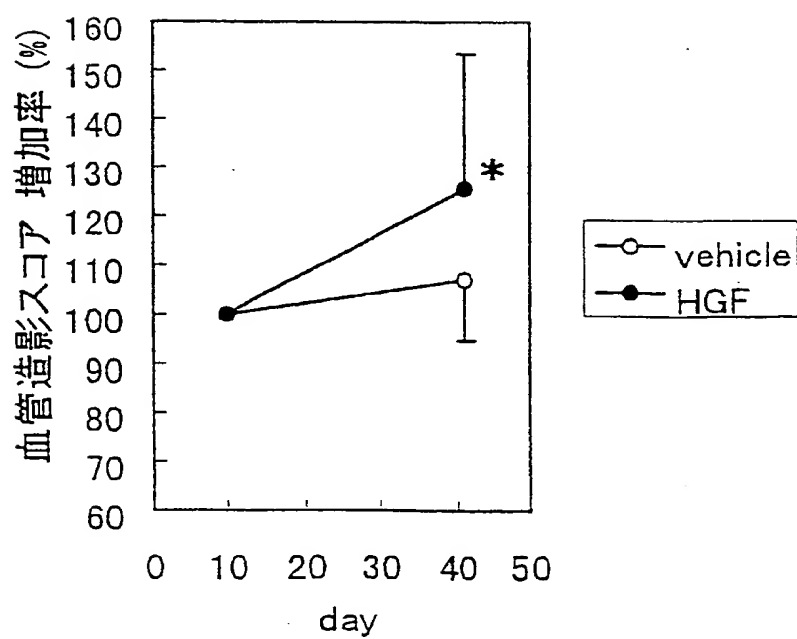


図 1 2

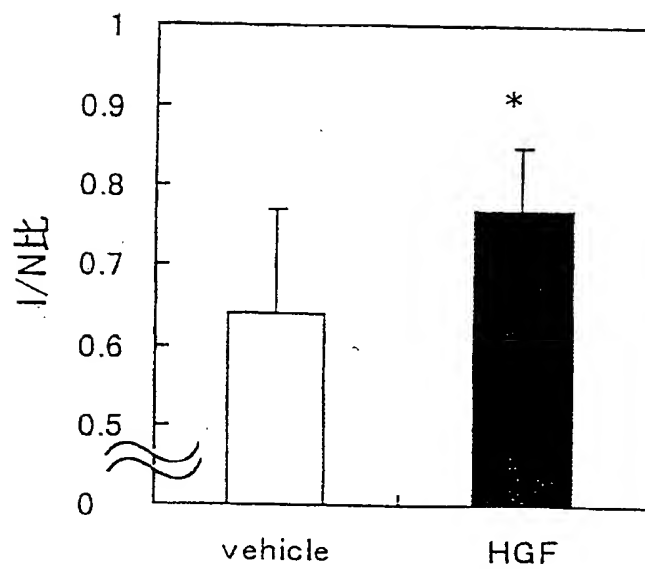
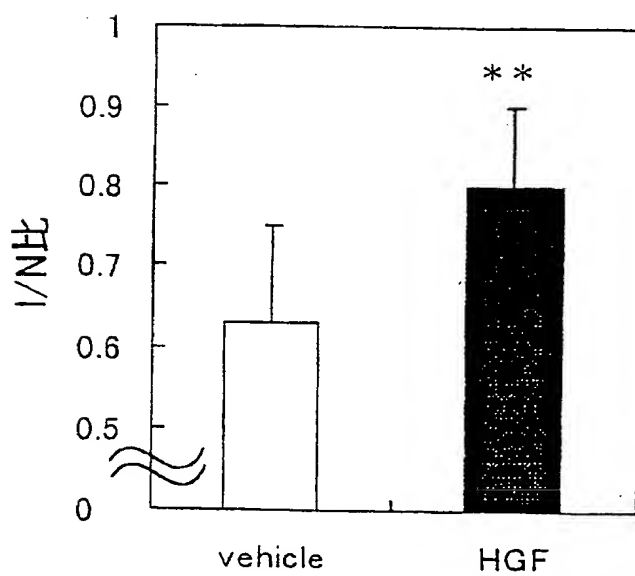


図 1 3



## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 99/04249

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>6</sup> A61K38/18

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>6</sup> A61K38/18

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS (STN)

## C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の<br>カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示   | 関連する<br>請求の範囲の番号 |
|-----------------|---|------------------|
| X               | 山口 高広 等、「慢性虚血心筋に対するレーザー心筋内欠陥新生術におけるHepatocyte Growth Factor併用効果の検討」、Japanese Circulation Journal, Feb 1998, Vol.62, Supplement I, p.407, P089 | 1-15             |
| X               | J P, 7-300426, A (雪印乳業株式会社) 14. 11月. 1995 (14. 11. 95) 特許請求の範囲、【0008】、【0009】、【0013】<br>&WO, 95/29694, A1 &EP, 784980, A1<br>&US, 5840311, A   | 1-15             |

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

08. 11. 99

国際調査報告の発送日

16.11.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

滝下 浩一

4 C 9284

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

| C (続き). 関連すると認められる文献 |  |                                  |
|----------------------|--|----------------------------------|
| 引用文献の<br>カテゴリー*      | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示  | 関連する<br>請求の範囲の番号                 |
| X                    | JP, 8-295634, A (住友製薬株式会社) 12. 11月.<br>1996 (12. 11. 96) 特許請求の範囲、【0011】<br>ファミリーなし   | 1-15                             |
| X<br>Y               | JP, 5-97694, A (電気化学工業株式会社) 20. 4月.<br>1993 (20. 04. 93) 【請求項3】、【0010】、<br>【0036】<br>ファミリーなし   | 1-8, 11, 12, 15<br>9, 10, 13, 14 |
| X<br>Y               | WO, 93/03061, A1 (東レ株式会社) 18. 2月.<br>1993 (18. 02. 93) 請求の範囲、第29ページ第19行<br>-第30ページ第3行<br>&EP, 550769, A1   | 1-8, 11, 12, 15<br>9, 10, 13, 14 |
| X<br>Y               | JP, 6-340546, A (中村 敏一) 13. 12月.<br>1994 (13. 12. 94) 特許請求の範囲、【0012】<br>&WO, 93/08821, A1 &EP, 724884, A1  | 1-8, 11, 12, 15<br>9, 10, 13, 14 |
| Y                    | Van BELLE, Eric et al, Potentiated Angiogenic Effect of<br>Scatter Factor/Hepatocyte Growth Factor via Induction of<br>Vascular Endothelial Growth Factor, Circulation, May 1998,<br>Vol. 97, No. 4, pp. 381-390, Abstract, Discussion | 9, 10, 13, 14                    |